

Kombination von  $\mu$ CT und Hartgewebephistologie bei  
der Auswertung von *in-vivo* Untersuchungen an  
Knochenersatzmaterialien für den Schädelbereich

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Sandra Diebowski**

**geboren am 17.11.1989 in Bad Frankenhausen**

**Gutachter:**

- 1. Prof. Dr. Orlando Guntinas-Lichius, Jena**
- 2. Prof. Dr. Dr. Bernd W. Sigusch, Jena**
- 3. Prof. Dr. Konrad Schwager, Fulda**

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 02. Dezember 2014**



## Abkürzungsverzeichnis

BIC	bone-implant-contact
csv	comma separated values
CT	Computertomographie
DBPO	Dibenzylperoxid
DICOM	Digital Imaging and Communications in Medicine
FKRZ	Fremdkörperriesenzelle
FKRZR	Fremdkörperriesenzellreaktion
GB	Gigabyte
GBO	Graphische Benutzeroberfläche
GEE	Generalized Estimating Equations
HA	Hydroxylapatit
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
ID	Identifikator
JPEG	Joint Photographic Experts Group
MG	Masson-Goldner-Färbung
MMA	Methylmethacrylat
MRT	Magnetresonanztomographie
NZWR	New Zealand White Rabbits
PEEK	Polyetheretherketon
PMMA	Polymethylmethacrylat
ROI	Region of interest
TCL	Tool Command Language
TCP	Tricalciumphosphat
UDMA	Urethandimethacrylat
UD	Copolymer aus UDMA und Dimethacrylat
UM	Copolymer aus UDMA und Monomethacrylat
Vv.	Venae

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1	Knochenersatz im Bereich der Schädelkalotte	3
2.1.1	Aufbau des menschlichen Schädelknochens	3
2.1.2	Anforderungen an ein Implantat im Bereich der Schädelkalotte	4
2.1.3	Reaktion des Körpers auf die Implantation und das Knochenersatzmaterial	5
2.2	Knochenersatzmaterialien im Bereich der Schädelkalotte	6
2.2.1	Körpereigenes Material	6
2.2.1.1	Autogener Knochen	6
2.2.1.2	Allogener Knochen	6
2.2.2	Alloplastische Materialien	7
2.2.2.1	Titan	7
2.2.2.2	Keramiken	7
2.2.2.2.1	Tricalciumphosphat (TCP)	7
2.2.2.2.2	Hydroxylapatit (HA)	8
2.2.2.2.3	Glaskeramiken und Biogläser	8
2.2.2.3	Kunststoffe	8
2.2.2.3.1	Polymethylmethacrylat(PMMA) -Knochenzement	8
2.2.2.3.2	Polyetheretherketone (PEEK)	9
2.2.2.4	Composit-Materialien	9
2.3	Das Tiermodell „Kaninchen“	10
2.4	Methoden zur Datenerhebung und -auswertung	10
2.4.1	Histomorphometrie	10
2.4.2	μCT	11
<b>3</b>	<b>Zielstellung</b>	<b>12</b>
<b>4</b>	<b>Methodik</b>	<b>14</b>

4.1	Implantatmaterialien	14
4.1.1	Form der Implantate	14
4.1.2	Tricalciumphosphat (TCP)	15
4.1.3	Polymer	15
4.1.4	Composit	15
4.2	Tierexperimentelle Studie	16
4.2.1	Implantation	17
4.2.2	Explantation	18
4.3	Anfertigung der histologischen Präparate	19
4.3.1	Hartgewebephistologie	19
4.3.2	Weichgewebephistologie	20
4.4	Histomorphometrie der Hartgewebephistologien	21
4.4.1	Lichtmikroskopie	21
4.4.2	Die erste Histomorphometrie-Software	23
4.4.3	Die neu entwickelte Morphometrie-Software „Histo-Gap“	24
4.4.3.1	Entwicklungsarbeit	24
4.4.3.2	Funktionalität	25
4.4.3.3	Anwendung von „Histo-Gap“ auf die Hartgewebephistologien des Versuchs	26
4.4.4	Semiquantitative Beurteilung der Kontroll-Implantate aus TCP	28
4.5	Qualitative Beurteilung der Weichgewebephistologien	29
4.6	$\mu$ CT	30
4.6.1	Aufbau eines herkömmlichen $\mu$ CT-Geräts	30
4.6.2	Scanbedingungen der $\mu$ CT-Aufnahmen des Versuchs	31
4.7	Visualisierung und Bearbeitung der 3D-Datensätze mit Hilfe von Avizo <sup>®</sup> Fire 6.3	33
4.7.1	Grundlagen	33
4.7.1.1	Bildformat	33
4.7.1.2	Bildvorverarbeitung	33
4.7.1.3	Segmentierung	34
4.7.2	Die 3D-Software Avizo <sup>®</sup> Fire 6.3	34
4.7.2.1	Visualisierung der 3D-Datensätze	35
4.7.2.2	Segmentierung der $\mu$ CT-Datensätze	36
4.7.3	Export von virtuellen 2D-Schnitten aus den $\mu$ CT-Datensätzen und Auswertung mittels „Histo-Gap“	38
4.7.3.1	Grundlagen	38

4.7.3.2	Auswertung der virtuellen 2D-Schnitte	39
4.8	Statistische Auswertung	40
4.8.1	Aufbereitung der erhobenen Daten	40
4.8.2	Beschreibung der statistischen Methode	41
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>43</b>
5.1	Entwicklung der Morphometrie-Software „Histo-Gap“	43
5.1.1	Evaluierung der Software von 2011	43
5.1.2	Konzeption der neuentwickelten Morphometrie-Software „Histo-Gap“	44
5.1.2.1	Definition und Umsetzung des Dateninputs der Software	45
5.1.2.2	Definition und Umsetzung des Datenoutputs der Software	46
5.1.2.3	Die graphische Benutzeroberfläche der Software	46
5.1.3	Testphase mit Evaluierung der Betaversionen	48
5.1.4	Ergebnis der Entwicklungsarbeit	50
5.1.5	Zusammenfassung und Vergleich der evaluierten Softwares	52
5.2	Osseointegration der Hartgewebhistologien mit der Polymerkomponente UM oder UD	53
5.2.1	Verteilung der Daten und Regressionsanalyse	53
5.2.2	BIC der Implantate mit den Polymerkomponenten UM oder UD	55
5.2.2.1	Vergleich des BICs der Polymerkomponente UM und UD bezogen auf die Verweildauern von 3, 6 und 9 Monaten	55
5.2.2.2	Vergleich der Polymer-Kontrolle, des bearbeiteten und unbearbeiteten Composites in den Gruppen mit UM oder UD	56
5.3	Auswertung der Kontroll-Implantate aus TCP	58
5.3.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	61
5.4	Untersuchung der Osseointegration in den 3D-Datensätzen der Implantate	62
5.4.1	Testung der Segmentierungsprinzipien	62
5.4.1.1	Evaluierung des Segmentierungsprinzips mit Hilfe eines Schwellenwerts	63
5.4.1.2	Evaluierung des Segmentierungsprinzips der Kantenerkennung	65
5.4.1.3	Evaluierung des Segmentierungsprinzips des Region Growings	66
5.4.1.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	67
5.4.2	Entwicklung eines Algorithmus für die Beurteilung der Osseointegration anhand von $\mu$ CT-Datensätzen	67

5.4.2.1	Implementierung zweier neuer Software-Module in Avizo® Fire 6.3	68
5.5	Vergleich der Hartgewebephistologien und der erstellten 2D-Abbildungen des ausgewählten 3D-Datensatzes	69
5.6	Auswertung der Weichgewebephistologien	70
5.6.1	Bindegewebephistologien	70
5.6.2	Hirngewebephistologien	71
5.6.3	Implantatferne Hirngewebeprobe	73
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>74</b>
6.1	Diskussion der Methode	74
6.1.1	Beurteilung der Weichgewebephistologien mit Hilfe eines Scores	74
6.1.2	Hartgewebephistologien	76
6.1.2.1	Auswertung mit Hilfe eines Scores	76
6.1.2.2	Histomorphometrie	76
6.1.3	μCT	79
6.2	Diskussion der Ergebnisse	81
6.2.1	Auswahl des Tiermodells	81
6.2.2	Entzündungs- und Fremdkörperreaktion in den Weichgewebephistologien	83
6.2.3	Hartgewebephistologien	84
6.2.3.1	Kontroll-Implantate aus TCP	84
6.2.3.2	Regressionsanalyse des BICs vom Schädeläußeren zum -inneren	85
6.2.3.3	BIC in den Hartgewebephistologien	85
6.2.4	Vergleich von μCT und Histologie	87
6.3	Diskussion der statistischen Methode	89
<b>7</b>	<b>Schlussfolgerungen</b>	<b>91</b>
<b>8</b>	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis</b>	<b>92</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>109</b>
9.1	Protokolle	109



9.1.1	„Jenaer Schädelmodell“	109
9.1.2	Anfertigung der Hartgewebephistologien nach der Trenn-Dünnschliff-Technik von Donath	111
9.1.3	Anfertigung der Weichgewebephistologien	112
9.1.4	Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Weichgewebephistologien	112
9.1.5	Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Hartgewebephistologien	113
9.1.6	Modifizierte Masson-Goldner-Färbung der Hartgewebephistologien	113
9.2	Anzahl der histologischen Schnitte für die Auswertung	114
9.3	Graphische Benutzeroberfläche (GBO)	115
9.3.1	„Histo-Gap“	115
9.3.2	Avizo <sup>®</sup> Fire 6.3	119
9.4	Algorithmus zum Export virtueller 2D-Schnitte aus Avizo <sup>®</sup> Fire 6.3	121
9.5	Manuale der Software-Anwendungen	122
9.5.1	„Histo-Gap“	122
9.5.2	Avizo <sup>®</sup> Fire 6.3	123
9.6	Ergebnistabellen der Histomorphometrie-Software	129
9.6.1	Erste Histomorphometrie-Software	129
9.6.2	„Histo-Gap“	129
9.7	Zahlencodierungen für SPSS Statistics <sup>®</sup>	130
9.8	Abbildungsverzeichnis	131
9.9	Tabellenverzeichnis	133
9.10	Danksagung	134
9.11	Lebenslauf	135
9.12	Ehrenwörtliche Erklärung	136

# **1 Zusammenfassung**

Im Bereich der Schädelkalotte werden Knochenersatzmaterialien zur Defektauffüllung nach z.B. Traumata, Infektionen oder Tumorentfernungen genutzt (Ming-Yih et al. 2002, Tadros und Costantino 2008, Goiato et al. 2009, Neumann 2009). Dabei stehen unterschiedlichste Werkstoffe zur Verfügung. Diese müssen für die Implantation in die Schädelkalotte atoxisch, biokompatibel, nicht karzinogen, korrosionsstabil, sterilisierbar und preiswert in der Herstellung sein (Endres et al. 2005, Grossterlinden et al. 2006, Tadros und Costantino 2008, Goiato et al. 2009). Bisher wurde kein ideales Material gefunden, welches die genannten Anforderungen der Schädelkalotte in vollem Maße erfüllt (Maier 2009). Daher wurden in einem Kooperationsprojekt zwei neue TCP-Polymer-Composit-Implantate entwickelt und im Rahmen dieser Arbeit evaluiert. Das Ziel bestand hierbei darin, die Biokompatibilität, Funktionalität und Osseointegration der Knochenersatzmaterialien zu beurteilen und die Eignung für den Einsatz im Schädelknochen zu evaluieren. Daneben sollte geprüft werden, ob sowohl die Methode der  $\mu$ CT als auch die Histologie zur Bewertung der Materialeigenschaften geeignet sind. Um diese Ziele zu erreichen, wurden standardisierte Auswertungsmethoden benötigt, die es innerhalb dieser Arbeit zu entwickeln galt. Dafür sollten objektivierbare Scores zur Beurteilung der Weichgewebe- und Hartgewebephistologien, sowie eine Morphometrie-Software zur Auswertung der Hartgewebepreparate entwickelt und 3D-Datensätze der Implantate softwareunterstützt evaluiert werden. Dazu wurden in einer tierexperimentellen Studie die Composit-Implantate sowie Kontrollimplantate aus zwei verschiedenen reinen Polymeren und reinem Tricalciumphosphat in den Schädelknochen von Kaninchen eingebracht und nach jeweils 3, 6 und 9 Monaten explantiert. Dabei erfolgten die Entnahme der Implantate mit den umliegenden Knochen und Weichgewebe sowie die Einbettung in Methacrylat. Von den Proben wurden  $\mu$ CT-Aufnahmen angefertigt und die gewonnenen 3D-Datensätze mit Hilfe einer Visualisierungssoftware bearbeitet. Dabei wurden die Möglichkeiten zur Abgrenzung der Composit-Implantate von ihrer Umgebung mittels Segmentierung evaluiert, um die Osseointegration in den 3D-Datensätzen zu ermitteln. Ebenfalls wurde diese Software durch Entwicklung eines Algorithmus zur Erstellung und zum Export von virtuellen 2D-Schnitten aus den  $\mu$ CT-Aufnahmen genutzt.

Nach der Erstellung der 3D-Datensätze erfolgte die Anfertigung von Hart- bzw. Weichgewebephistologien aus den Gewebeproben sowie deren lichtmikroskopische Untersuchung. Die Weichgewebephistologien wurden auf Entzündungs- und Fremdkörperreaktionen untersucht und die Zellzahlen mit Hilfe eines Scores interpretiert. Bei

den Hartgewebhistologien wurden mittels einer in dieser Arbeit neu entwickelten Histomorphometrie-Software der Knochen-Implantat-Kontakt (bone-implant-contact, BIC) und der Knochen-Implantat-Abstand untersucht sowie die Ergebnisse statistisch analysiert. Ebenfalls erfolgten die Auswertung der virtuellen 2D-Schnitte der  $\mu$ CT-Aufnahmen mit dieser Software und der Vergleich mit den Ergebnissen der Hartgewebhistologien. Die Kontrollimplantate wurden quantitativ mit Hilfe eines Scores auf den Grad an Resorption untersucht. Die statistische Analyse der Ergebnisse der BICs lieferte eine relativ hohe Streuung der Daten und nach Zusammenfassung aller drei Zeiträume einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden eingesetzten TCP-Polymer-Composit-Implantaten. Bei der 2D- und 3D-Methode wurde in den Hartgewebhistologien ein geringerer Abstand zwischen dem Knochen und Implantat im Vergleich zur  $\mu$ CT gemessen. Dieses Ergebnis war nicht statistisch signifikant ( $p > 0,05$ ). Bei der Auswertung der Kontroll-Implantate aus TCP-Implantate nahm der Resorptionsgrad mit zunehmender Verweildauer bei einem deutlichen Knochenaufbau zu. Die Binde- und Hirngewebeproben wiesen nach allen Zeiträumen keine oder nur eine geringe Entzündungs- und Fremdkörperreaktion auf.

Die erhobenen Ergebnisse zeigen, dass die neuen Composit-Implantate biokompatibel, stabil und nicht resorbierbar waren. Dabei wird eines der beiden Polymere aufgrund des geringfügig besseren Einwachsverhaltens für nachfolgende Versuche bevorzugt, wobei beide Implantatmaterialien für den Einsatz im Schädelknochen geeignet wären. Die Ergebnisse wurden hierbei durch verschiedene Faktoren wie z.B. der optimierten Anzahl an Versuchstieren, Reaktion der Tiere auf die OP und den zufälligen biologischen Komponenten beeinflusst. Die entwickelte Morphometrie-Software ist zur Beurteilung des BICs der Proben geeignet, wobei der BIC als morphometrischer Parameter die physiologischen Bedingungen des Schädelknochens repräsentiert. Wenn eine softwareunterstützte Analyse der Proben nicht möglich ist, sollten objektivierbare Scores verwendet werden. Daneben sind die Vor- und Nachteile der beiden Auswertungsmethoden dieses Versuchs zu beachten: Mit Hilfe der Histologie konnten alle Implantatmaterialien und Gewebe abgebildet werden, wobei diese Technik jedoch zur Zerstörung der Gewebeproben führt. Im Vergleich dazu können die 3D-Datensätze der  $\mu$ CT beliebig oft bearbeitet und die Knochenstrukturen analysiert werden. Limitierend ist hierbei die fehlende Visualisierung der Weichgewebe und Materialien mit einer geringen Röntgendichte. Zur Steigerung der Aussagekraft sollten diese beiden Methoden ergänzend für die Beurteilung der Biokompatibilität und Funktionalität genutzt werden. Dies ermöglicht bei einer optimierten Anzahl an Versuchstieren die Nutzung möglichst vieler Informationen eines Experiments.

## **2 Einleitung**

Im Rahmen dieser Dissertation wurden verschiedene Implantatmaterialien in die mechanisch unbelastete Schädelkalotte von Kaninchen mit Kontakt zum Liquor cerebrospinalis eingesetzt. Anhand dessen erfolgte die Beurteilung der Osseointegration, Biokompatibilität und Funktionalität der verwendeten Knochenersatzmaterialien. Diese sollen ebenfalls in weiterführenden Versuchen für den Einsatz im menschlichen Schädelknochen getestet werden.

### **2.1 Knochenersatz im Bereich der Schädelkalotte**

#### **2.1.1 Aufbau des menschlichen Schädelknochens**

Der menschliche Schädelknochen besteht aus dem Gesichtsschädel (Viscerocranium) und Hirnschädel (Neurocranium). Ein Teil des Hirnschädels ist die Schädelkalotte (Calvaria bzw. Schädeldach), die aus Anteilen des Stirnbeins (Os frontale), der beiden Scheitelbeine (Ossae parietalis) und des Hinterhauptsbeins (Os occipitale) besteht. Sie stellt im Gegensatz zu den belasteten Kieferknochen einen unbelasteten Teil des Schädels dar (Schneider 2003, Voigt und Schneider 2009). Dieser Bereich der Schädelknochen gehört beim Menschen neben dem Brustbein, den Rippen, Schulterblättern und Darmbeinschaufeln zu den platten Knochen. Die äußerste Schicht des Schädelknochens bildet die Lamina externa als konvex verlaufende kompakte Knochenschicht, welche fließend in die ca. 5 mm breite Diploe übergeht. Diese besteht zu einem hohen Anteil aus spongiösem Knochen mit kleinen Hohlräumen und festen Trabekeln. In den Hohlräumen liegen die Vv. diploicae, welche in Verbindung mit den Venen des äußeren Schädelknochens, den Venen der Dura und dem venösen Sinus stehen. An die Diploe schließt sich mit der konkaven Lamina interna eine weitere dünne kompakte Knochenschicht an. Sie stellt die innerste Schicht des menschlichen Schädelknochens dar (Lippert 2011). Der schematische Aufbau des menschlichen Schädelknochens ist in Abbildung 1 dargestellt.

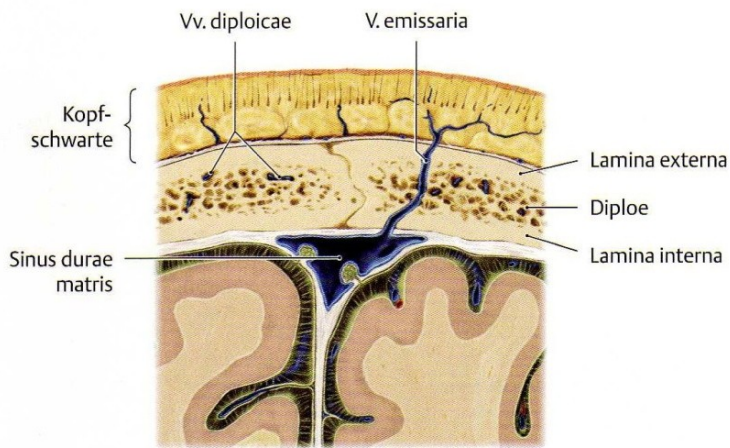


Abbildung 1: Aufbau des menschlichen Schädelknochens (Schünke et al. 2006)

Das Regenerationspotential des menschlichen Schädelknochens geht von der Dura und dem Periost aus, da diese beiden Schichten die Vorläuferzellen von Osteoblasten enthalten. Mit zunehmendem Alter nimmt das Wachstumspotential aufgrund der geringeren Konzentration an Wachstumsfaktoren und geringeren Proliferationsrate sowie Genexpression der Zellen ab (Greenwald et al. 2000, Ascherman et al. 2001, Gosain et al. 2003, Lin et al. 2012).

### 2.1.2 Anforderungen an ein Implantat im Bereich der Schädelkalotte

Im Bereich der Schädelkalotte werden Knochenersatzmaterialien zur Defektauffüllung nach z.B. angeborenen knöchernen Fehlbildungen, Schädel-Hirn-Traumata, Tumorentfernung oder Infektionen genutzt (Ming-Yih et al. 2002, Tadros und Costantino 2008, Goiato et al. 2009, Neumann 2009). Dabei stehen verschiedene Materialien wie z.B. Titan, Glaskeramiken, Calciumphosphat, Polymermischungen oder Composite zur Verfügung. Diese müssen als Grundvoraussetzung für die Implantation in die Schädelkalotte atoxisch, biokompatibel, nicht karzinogen, korrosionsstabil, sterilisierbar und preiswert in der Herstellung sein (Endres et al. 2005, Grossterlinden et al. 2006, Tadros und Costantino 2008, Goiato et al. 2009).

Dient die Schädelkalotte als Implantationsort, hat das Implantat Kontakt mit verschiedenen Gewebsarten wie der dünnen bedeckenden Haut mit Weichgewebe und gegebenenfalls auch mit der Hirnhaut (Dura), dem Liquorraum und dem Hirngewebe. Bei der Ausdehnung des Implantats bis in die Nasennebenhöhlen kommt es zum Kontakt mit der keimbesiedelten Schleimhaut dieser Strukturen (Beleites et al. 2001, Voigt und Schneider 2009). Daher soll durch eine hohe Biokompatibilität der Knochenersatzmaterialien eine mögliche Abstoßungsreaktion des Gewebes und die Ansiedlung von Bakterien verhindert werden.

Aufgrund der geringen Knochenumbauaktivität des Schädelknochens sollen die Materialien nach der Implantation stabil im Defekt verbleiben, nicht resorbiert werden sowie dem Druck gegenüber der Hirnmasse und dem Liquor und den äußeren mechanischen Einwirkungen stand halten (Park et al. 2001, Maier 2009, Voigt und Schneider 2009). Bisher wurde kein ideales Material gefunden, welches die genannten Anforderungen der Schädelkalotte in vollem Maße erfüllt (Maier 2009).

### **2.1.3 Reaktion des Körpers auf die Implantation und das Knochenersatzmaterial**

Während der operativen Implantation eines Knochenersatzmaterials in die Schädelkalotte kommt es zur Verletzung von Geweben und Blutgefäßen und damit zur Freisetzung von Gewebsmediatoren. Diese leiten die akute Wundheilungsphase und Reparaturprozesse ein (Kirkpatrick et al. 2002, Anderson 2011). Die Intensität dieser Vorgänge wird z.B. durch die Größe des Schadens, dem Ausmaß an untergegangenen Zellen sowie durch die Eigenschaften des eingesetzten Materials beeinflusst. Darüber hinaus werden durch den Gewebsschaden die Gerinnungs- und Entzündungssysteme des Blutes sowie Akute-Phase-Proteine aktiviert. Diese heften sich an die Implantat-Oberfläche und führen innerhalb von wenigen Stunden zur Ausbildung eines Thrombus um das Implantat herum. In den folgenden drei bis fünf Tagen (Anderson 2011) bildet sich ein Granulationsgewebe um das eingesetzte Knochenersatzmaterial aus, welches im Wesentlichen aus Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten und neuen Blutgefäßen besteht. Daneben setzen die vorhandenen Zellen auf der Implantatoberfläche Wachstumsfaktoren frei und fördern dadurch die Ausbildung von Blutgefäßen und die Regeneration des Gewebes. Dieser Vorgang bildet nach ca. einer Woche den Abschluss der Wundheilung und führt zum restitutio ad integrum der Strukturen im Bereich der Schädelkalotte (Kirkpatrick et al. 2002, Anderson et al. 2008). Parallel zu diesen Vorgängen reagiert das Gewebe auf das Implantatmaterial als „Fremdkörper“. Dabei fusionieren Monozyten zu Makrophagen und diese wiederum zu Fremdkörperriesenzellen (FKZR), welche sich an die Implantatoberfläche heften. Das Ausmaß der Fremdkörperriesenzellreaktion (FKRZR) wird z.B. durch die Konzentration an Zytokinen, Materialeigenschaften und -zusammensetzung sowie durch die Implantatgröße und –form beeinflusst. Für eine optimale stabile Integration eines Implantats in den Schädelknochen ist eine sehr geringe Fremdkörperreaktion günstig, da diese sonst zur Ausbildung einer fibrösen Kapsel um den Probekörper, zur Implantatlockerung und zu einem erhöhten Infektionsrisiko führt. Daher sollte die Entzündungs- und Fremdkörperreaktion möglichst gering ausfallen,

sodass es bei einer hohen Biokompatibilität des Materials nach wenigen Tagen zur Ausbildung von neuem Knochen durch hämatogen einwandernde Osteoblasten kommen kann (Osborn 1985, Hollinger und Kleinschmidt 1990, Costantino et al. 2002, Anderson et al. 2008).

## **2.2 Knochenersatzmaterialien im Bereich der Schädelkalotte**

### **2.2.1 Körpereigenes Material**

#### **2.2.1.1 Autogener Knochen**

Als Knochenersatzmaterial wird als körpereigenes Material am häufigsten Knochen aus dem Beckenkamm, den Rippen und dem knöchernen Schädeldach verwendet. Er besitzt eine natürliche Biokompatibilität und ist stark osteokonduktiv (Costantino et al. 2002, Tadros und Costantino 2008, Neumann 2009). Dadurch kommt es nach dem Wiedereinsetzen dieses Materials i.d.R. zu einer geringeren Inflammation, Immunreaktion und zur erleichterten Revaskularisierung des Gewebes (Cavalcanti et al. 2008). Wesentliche Nachteile des autogenen Knochens sind die Donor-Morbidität, lange OP-Zeiten, limitierte Verfügbarkeit, eine mögliche Resorption des Knochens durch den Körper und damit die Notwendigkeit eines zweiten operativen Eingriffes (Anderson et al. 2008, Mino-Farina et al. 2009). Weiterhin ist bei autogenen Knochen die intraoperative Anpassbarkeit an den knöchernen Defekt limitiert, was v.a. im Gesichtsbereich zu ästhetischen Problemen führt (Beleites et al. 2001, Clokie et al. 2002).

#### **2.2.1.2 Allogener Knochen**

Allogener Knochen wird von menschlichen Spendern gewonnen. Nach dem Tod des vorher evaluierten Donators wird der benötigte Knochen explantiert und dieser für eine ausreichende Infektionssicherheit durch das heutzutage etablierte Tutoplast<sup>®</sup>-Verfahren gereinigt, konserviert und sterilisiert (Schneider 2003, Kriegel et al. 2007, Neumann 2009, Rohde 2013). Allogener Knochen ist durch seine hohe Verfügbarkeit für das Auffüllen von größeren Knochendefekten geeignet (Shand et al. 2002, Neumann 2009). Entscheidende Nachteile sind z.B. eine mögliche Resorption und Abstoßungsreaktion des Körpers gegen den

Spenderknochen sowie das Risiko der Übertragung von Erregern (Maier 2009, Brandt et al. 2010).

## **2.2.2 Alloplastische Materialien**

### **2.2.2.1 Titan**

Titan bildet nach der Implantation in die Schädelkalotte eine Oxidschicht auf seiner Oberfläche aus, welche das Metall vor Wechselwirkungen mit seiner Umgebung und Korrosion schützt. Durch diese Schicht ist Titan sehr biokompatibel und biologisch inert. (Branemark et al. 2001, Endres et al. 2005). Vorteile dieses Metalls sind das geringe Gewicht bei gleichzeitig hoher Stabilität sowie eine hohe Zug- und Druckfestigkeit. Nachteile stellen die Erzeugung von Abbildungsartefakten in CT- und MRT-Scans sowie die hohe Wärmeleitfähigkeit dieses Metalls dar. Dadurch kann es bei größeren Temperaturschwankungen zu Schmerzen und Missempfindungen im Bereich des Implantats kommen (Gladstone et al. 1995, Liu et al. 2004, Busenlechner et al. 2008, Maier 2009, Spetzger et al. 2010). Des Weiteren ist Titan durch die im OP üblicherweise vorhandenen Schneid- und Schleifinstrumente nicht an den Knochendefekt anpassbar, was die zusätzliche Abtragung von gesunden Knochen erforderlich machen kann (Tadros und Costantino 2008).

### **2.2.2.2 Keramiken**

#### **2.2.2.2.1 Tricalciumphosphat (TCP)**

Tricalciumphosphate ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) sind in ihrer chemischen Zusammensetzung dem menschlichen Knochen sehr ähnlich und besitzen dadurch eine gute Biokompatibilität (Lange et al. 2009, Ritman 2011). Sie werden industriell durch Sintern von pulverigen Materialien hergestellt. Nach dem Einbringen in die Schädelkalotte sollte ein Implantat aus TCP resorbiert werden, dabei dem menschlichen Knochen ein Gerüst zum Wachsen bieten und durch Anlagerung von Osteoblasten zur Knochenneubildung führen (Mino-Farina et al. 2009). Nachteile sind hierbei, dass diese Prozesse unvollständig verlaufen können, Materialien aus TCP im Vergleich zum Knochen eine geringere mechanische Stabilität aufweisen und die Keramik intraoperativ nicht bearbeitbar ist (Mino-Farina et al. 2009, Ritman 2011).



#### **2.2.2.2.2 Hydroxylapatit (HA)**

Das Hydroxylapatit ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) gehört zu den natürlichen Bestandteilen von Zähnen und Knochen, wodurch es sehr biokompatibel ist und wird durch seine poröse Struktur vom Schädelknochen durchwachsen sowie stabil integriert (Spetzger et al. 2010). Von Nachteil ist, dass diese Keramik brüchig und somit nicht zur Füllung von großen Defekten geeignet ist sowie unvollständig bzw. langsam resorbiert werden kann (Neumann 2009, Goiato et al. 2009, Spetzger et al. 2010).

#### **2.2.2.2.3 Glaskeramiken und Biogläser**

Die Biogläser bilden eine große heterogene Gruppe und bestehen im Wesentlichen aus einer Silicium-Aluminium-Phosphatbasis. In diese Grundstruktur können z.B. lösliche Calcium-, Natrium- oder Kaliumoxide zusätzlich integriert sein. Über diese Bestandteile treten die Biogläser mit Zellstrukturen und Botenstoffen in Kontakt, wodurch sie die Zellproliferation, -differenzierung und -organisation beeinflussen können (Hench 2006, Maier 2009). Diese Materialien weisen eine hohe Biokompatibilität, Osteokonduktivität sowie teilweise Osteoinduktion auf und erzeugen keine Artefakte in der Bildgebung. Nachteilig ist, dass einige Biogläser eine extreme Brüchigkeit und damit verbunden eine geringe Eignung zur intraoperativen Anpassung an einen Schädeldefekt besitzen, weshalb sie häufig als Compositmaterial mit Polymeren und Metallen verwendet werden (Hench 2006, Maier 2009, Spetzger et al. 2010). Eine Ausnahme stellt hierbei die am Institut für Glaschemie der FSU Jena entwickelte Glaskeramik Bioverit<sup>®</sup> dar. Dieses Material ist nicht löslich, nicht resorbierbar und korrosionsstabil. Durch die enthaltenen Phlogopitplättchen ist diese Glaskeramik sehr zäh, kann deshalb spanabhebend bearbeitet und somit intraoperativ gut an den Defekt angepasst werden (Beleites et al. 2001, Schneider et al. 2010).

#### **2.2.2.3 Kunststoffe**

##### **2.2.2.3.1 Polymethylmethacrylat(PMMA) -Knochenzement**

Bei PMMA handelt es sich um einen biokompatiblen, thermoplastischen und transparenten Kunststoff. Dieses Material wird durch Mischung einer flüssigen und einer pulvrigen Komponente hergestellt (Breusch und Kuhn 2003, Spetzger et al. 2010). Zusätzlich können

bei der Anfertigung Röntgenkontrastmittel oder Antibiotika integriert werden, um die Darstellung zu verbessern und die Infektionsraten zu verringern. Wesentliche Vorteile dieses Biomaterials sind seine preiswerte und technisch wenig aufwendige Herstellung, die gute Anpassung an Defekte in der Schädelkalotte und der hohe Widerstand gegen einwirkende Scherkräfte (Bruens et al. 2003, Goiato et al. 2009, Spetzger et al. 2010). Einen Nachteil stellt die bei der Mischung der Komponenten freigesetzte Polymerisationswärme von bis zu 70°C dar, welche zur Verletzung von umliegenden Gewebe, allergischen Reaktionen und Anheftung von Bakterien an das geschädigten Gewebe führen kann (Eppley 2003, Spetzger et al. 2010).

#### **2.2.2.3.2 Polyetheretherketone (PEEK)**

Kunststoffe aus PEEK sind synthetische Polymere mit einer hohen Biokompatibilität und Inertheit (Eppley 2003, Briem et al. 2005, Khoury et al. 2012). Wesentliche Vorteile sind ein geringes Gewicht, eine hohe Stabilität, die lange Haltbarkeit und kaum allergische Reaktionen (Goiato et al. 2009, Hanasono et al. 2009, Spetzger et al. 2010). Weiterhin ist PEEK strahlendurchlässig und erzeugt daher keine störenden Artefakte in CT- und MRT-Aufnahmen (Liu et al. 2004, Khoury et al. 2012). Ein möglicher Nachteil kann die biologische Innertheit von PEEK sein, durch welche es nach der Implantation zu einer geringeren Zelladhäsion und Osseointegration kommen kann (Briem et al. 2005, Khoury et al. 2012).

#### **2.2.2.4 Composit-Materialien**

Bei Compositen handelt es sich um zusammengesetzte Verbundwerkstoffe. Sie bestehen aus mindestens zwei verschiedenen Materialien, bei denen sich unterschiedliche Eigenschaften ergänzen sollen. Diese betreffen vor allem die osteokonduktiven bzw. mechanischen Eigenheiten der verwendeten Implantatmaterialien. Es können z.B. Titan mit Hydroxylapatit, Calciumphosphat mit Polymeren, Hydroxylapatit mit Tricalciumphosphat oder Biogläser mit Metallen oder Polymeren kombiniert werden (Hench 2006, Maier 2009, Neumann 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Composit-Implantate aus einer Polymerkomponente und TCP mit Hilfe der Histomorphometrie und  $\mu$ CT auf ihre Biokompatibilität und Osseointegration untersucht.

## **2.3 Das Tiermodell „Kaninchen“**

Tiermodelle sind für die Untersuchung von komplexen Gewebereaktionen eines Implantats mit dem umliegenden Gewebe notwendig. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Biokompatibilität und Osseointegration der Materialien am Kaninchen untersucht. Dieses gehört neben Mäusen, Ratten, Hunden, Schafen und Schweinen zu den am häufigsten genutzten Versuchstieren in der Implantologie. Bei der Auswahl eines Tiermodells sollten wichtige Faktoren wie Größe der Tiere, Kosten, Haltungsaufwand, Verträglichkeit des Tieres von Operationseingriffen, Verfügbarkeit und ethische Aspekte einer tierexperimentellen Studie beachtet werden (Pearce et al. 2007). Für diese Arbeit wurden Kaninchen als Versuchstiere eingesetzt, da sie eine geeignete Größe für die Implantation von Materialien im Schädelbereich besitzen, der Schädelknochen leicht zugänglich ist und sie sich in anderen Studien als geeignet erwiesen haben (Gosain et al. 2003, Cavalcanti et al. 2008, Bitschnau et al. 2009, Schneider et al. 2010). Des Weiteren sind Kaninchen verhältnismäßig wenig anspruchsvoll in ihrer Haltung und robust gegen prä- und postoperativen Stress sowie Infektionen. Sie erreichen die skelettale Reife nach ca. sechs Monaten und werden häufig zur Vorevaluation für nachfolgende Experimente genutzt (Pearce et al. 2007). Bei der Verwendung dieses Tiermodells muss beachtet werden, dass das Regenerationspotential der Schädelkalotte viel höher ist als beim Menschen und ebenfalls mit zunehmendem Alter abnimmt sowie sich der Aufbau des Schädelknochens zum Menschen leicht unterscheidet (Osborn 1985, Alberius et al. 1990, Gosain et al. 2003, Pearce et al. 2007).

## **2.4 Methoden zur Datenerhebung und -auswertung**

### **2.4.1 Histomorphometrie**

Bei der Histomorphometrie handelt es sich um die quantitative Analyse von Zellen, Zell- und Gewebestrukturen wie z.B. Knochen und Bindegewebe im Mikrometer-Bereich (Yeom et al. 2008, Kulak und Dempster 2010). Sie erfolgt i.d.R. anhand von zweidimensionalen histologischen Schnitten, in denen grundsätzlich vier verschiedene morphometrische Messungen durchgeführt werden können: Flächen- und Längenmessungen (Umfänge, Begrenzungen), Entfernungen zwischen zwei Punkten (Abstände) sowie Anzahlen. Bezogen auf das Implantat mit dem umliegenden Knochen lassen sich davon quantitative Parameter wie das Trabekelvolumen, der Knochen-Implantat-Abstand, die Osteoidoberfläche sowie die

Anzahl von Entzündungszellen und Resorptionsgrade morphometrisch ableiten (Parfitt et al. 1987). Dabei werden die verschiedenen Parameter zunehmend mit Hilfe einer semiautomatischen Software erhoben und ausgewertet (Kulak und Dempster 2010). Neben der Histomorphometrie stellt die  $\mu$ CT eine weitere geeignete Methode für die Beurteilung der Knochenstruktur dar und wurde daher im Rahmen dieser Arbeit zur Erstellung von 3D-Datensätzen der Implantate genutzt.

#### **2.4.2 $\mu$ CT**

Die in den frühen 1980er Jahren entwickelte  $\mu$ CT ist eine hochauflösende Computertomographie und für die Untersuchung der Knochenmorphologie und -architektur in Mäusen und anderen Kleintieren geeignet (Bouxsein et al. 2010). Im Vergleich dazu ist die  $\mu$ CT weniger für die Beurteilung von Weichgeweben geeignet, da diese eine zu geringe Röntgendichte besitzen und ohne Kontrastmittel nicht dargestellt werden (Faraj et al. 2009). Im Unterschied zu klinischen CT-Scannern können bei entsprechender Objektgröße unter optimalen Voraussetzungen Auflösungen bis in den Submikrometer-Bereich erzeugt werden (Ritman 2011). Um zusätzliche räumliche Informationen über die Knochenstrukturen in Ergänzung zur Histomorphometrie zu gewinnen, wurde diese Technik im Rahmen dieser Dissertation zur Beurteilung der Osseointegration der Schädelimplantate im genutzt.

### 3 Zielstellung

Im Bereich der Schädelkalotte werden Knochenersatzstoffe zur Defektauffüllung nach z.B. angeborenen knöchernen Fehlbildungen, Schädel-Hirn-Traumata, Tumorentfernung oder Infektionen genutzt (Ming-Yih et al. 2002, Tadros und Costantino 2008, Goiato et al. 2009, Neumann 2009). Dabei stehen verschiedene Materialien wie Titan, Glaskeramiken, Calciumphosphat, Polymermischungen oder Composite zur Verfügung. Diese müssen als Grundvoraussetzung für die Implantation in die Schädelkalotte atoxisch, biokompatibel, nicht karzinogen, korrosionsstabil, sterilisierbar und preiswert in der Herstellung sein (Endres et al. 2005, Grossterlinden et al. 2006, Tadros und Costantino 2008, Goiato et al. 2009). Bisher wurde kein ideales Material gefunden, welches die genannten Anforderungen der Schädelkalotte in vollem Maße erfüllt (Maier 2009). Aufgrund dessen erfolgte die Evaluierung neuer Knochenersatzmaterialien im Rahmen dieser Arbeit nach dem „Jenaer Schädelmodell“ (Voigt und Schneider 2009, Schneider et al. 2010). Es handelte sich dabei um Composit-Implantate aus Tricalciumphosphat (TCP) und zwei verschiedenen Polymeren, die in den Schädelknochen von Kaninchen eingebracht wurden. Neben diesen Probekörpern wurden Implantat-Kontrollen aus TCP und reinem Polymer in die Tiere implantiert. Nach jeweils 3, 6 und 9 Monaten erfolgte die Explantation und Evaluierung mittels Histologien und  $\mu$ CT-Aufnahmen.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Biokompatibilität und Osseointegration der Knochenersatzmaterialien zu beurteilen, die zwei verschiedenen Composit-Implantate zu vergleichen und die Eignung für den Einsatz im Schädelknochen zu evaluieren. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden standardisierte Auswertungsmethoden benötigt, die eine reproduzierbare, vergleichbare und statistische Analyse der Ergebnisse ermöglichen. Dafür sollen objektivierbare Scores zur Beurteilung der Weichgewebe- und Hartgewebephistologien, sowie eine Morphometrie-Software zur Auswertung der Hartgewebepräparate entwickelt und 3D-Datensätze der Implantate softwareunterstützt evaluiert werden.

Die Anwendung dieser Methoden ermöglicht damit eine umfangreiche Analyse der Daten.

Die folgenden Fragen galt es im Verlauf zu beantworten:

- Sind die evaluierten Composit-Implantate für den Einsatz im Schädelknochen geeignet?
- Gibt es Unterschiede in dem Ausmaß an Osseointegration und Biokompatibilität der zwei analysierten Composit-Implantate?

- Mit welchen Auswertungsmethoden lässt sich der Knochen-Implantat-Kontakt (bone-implant-contact, BIC) möglichst semiautomatisch in den Hartgewebhistologien und den 3D-Datensätzen erheben?
- Ist die neuentwickelte Morphometrie-Software für die Beurteilung der Osseointegration in den Hartgewebhistologien geeignet?
- Ist die  $\mu$ CT zur Beurteilung der Osseointegration und Biokompatibilität der Materialien geeignet?
- Ist die Histologie zur Beurteilung der Osseointegration und Biokompatibilität der Materialien geeignet?
- Kann die  $\mu$ CT die histologische Beurteilung als Auswertungsmethode ersetzen?
- Mit welcher standardisierten Vorgehensweise lässt sich die Entzündungs- und Fremdkörperreaktion der Weichgewebhistologien untersuchen?

## 4 Methodik

### 4.1 Implantatmaterialien

Im Rahmen eines Kooperationsprojektes der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde Jena, der 3di GmbH Jena und INNOVENT e.V. Technologieentwicklung Jena wurden neue Knochenersatzmaterialien entwickelt (Linde et al. 2010, Schneider et al. 2010), die innerhalb dieser Arbeit ihre Biokompatibilität und Funktionalität evaluiert wurden.

#### 4.1.1 Form der Implantate

Die Implantatprobekörper bestehen aus einem zylindrischen Grundkörper mit einem Durchmesser von 5 mm und einer Höhe von 3 mm. Der Grundkörper besitzt einen flachen zylindrischen Deckel mit einem Durchmesser von 9 mm und einer Höhe von 1 mm aufgebracht. Daraus ergab sich für alle verwendeten Implantate eine Gesamthöhe von 4 mm und im medianen Querschnitt eine „T-Form“. Dieses Design wurde gewählt, da es den Vorgaben des Protokolls des „Jenaer Schädelmodells“ entsprach, welches im Anhang unter 9.1.1 zu finden ist. Abbildung 2 zeigt die Form der verwendeten Implantate.



Abbildung 2: Implantatkörper mit Deckel und zylindrischem Grundkörper

#### **4.1.2 Tricalciumphosphat (TCP)**

Die Herstellung der TCP-Implantate erfolgte bei der Firma 3di GmbH (Saalbahnhofstraße 25c, 07743 Jena, Deutschland) unter Verwendung eines TCP-Rohgranulats (betriebsinterne Daten 3di GmbH, Jena) und einer wasserlöslichen organischen Binderflüssigkeit. Das TCP-Granulat wurde gesiebt und nachfolgend in Rapid Prototyping-Technik (Rechtenbach et al. 2009) mittels 3D-Drucker (z-corp-Drucker<sup>®</sup>, 3D Systems, USA) in formstabile Körper gebracht. Danach fand das Sintern nach Protokoll (betriebsinterne Daten 3di GmbH, Jena) statt, wobei die organische Binderflüssigkeit entfernt wurde und als Resultat Probekörper aus reinem gesinterten TCP vorlagen.

#### **4.1.3 Polymer**

Die Anfertigung der Polymere für die Composit- und Kontrollimplantate erfolgte bei der Firma 3di GmbH. Die Komponenten zur Herstellung der Implantate aus Polymer wurden in Form gegossen und auspolymerisiert. Dafür kam als Basismonomer das Urethandimethacrylat (UDMA) und zur Verringerung der Viskosität jeweils ein Comonomer Monomethacrylat (M, Endprodukt Copolymer UM) oder Dimethacrylat (D, Endprodukt Copolymer UD) zum Einsatz (betriebsinterne Daten 3di GmbH, Jena). Die Polymerisation erfolgte bei hohen Temperaturen (betriebsinterne Daten 3di GmbH, Jena) unter Verwendung des Katalysators Dibenzoylperoxid (DBPO, VWR International GmbH, Hilpertstraße 20a, 64295 Darmstadt, Deutschland).

#### **4.1.4 Composit**

Die Comosit-Probekörper bestanden aus einem TCP-Grundkörper, dem Basismonomer und jeweils einem Copolymer (M oder D). Dazu wurden nach dem Sintern die offenen Porenräume der TCP-Grundkörper jeweils mit dem UDMA sowie UM oder UD infiltriert (betriebsinterne Daten 3di GmbH, Jena). Anschließend erfolgte wiederum eine radikalische Polymerisation durch Dibenzoylperoxid (DBPO). Dadurch konnte die Stabilität und Festigkeit der TCP-Sinterkörper signifikant erhöht werden. Um eluierbare und toxische Stoffe aus den Implantaten zu entfernen, kamen Behandlungen mit destilliertem Wasser bei hohen Temperaturen, mit Ethanol oder Aceton bei Raumtemperatur sowie Mikrowellenextraktionen



mit destilliertem Wasser, Ethanol oder Aceton bei erhöhten Temperaturen unter Druck zum Einsatz (betriebsinterne Daten 3di GmbH, Jena).

## 4.2 Tierexperimentelle Studie

Die tierexperimentelle Studie wurde durch das Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz (Genehmigungsnummer 02-036/08, Bad Langensalza, Deutschland) genehmigt. Die Tiere wurden von der Firma Harlan Winkelmann GmbH (Harlan Laboratories B.V., Kreuzelweg 53, 5961 Hors, Niederlande) bereitgestellt.

Die tierexperimentelle Studie wurde nach dem Protokoll „Jenaer Schädelmodell“ durchgeführt (Voigt und Schneider 2009, Schneider et al. 2010). Dieses ist im Anhang unter 9.1.1 aufgelistet. Bei dieser Vorgabe handelt es sich um ein in der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrheilkunde Jena entwickeltes und seit ca. 15 Jahren angewendetes Tiermodell, welches das Einwachsen von Materialien im Schädelbereich von Kaninchen untersucht (Voigt und Schneider 2009, Schneider et al. 2010). Ein Schema dieses Modells ist in Abbildung 3 dargestellt. Die Implantate wurden in die Schädeldecke (Stirnbein) von 18 weiblichen NZWR (New Zealand White Rabbits) eingesetzt. Die Kaninchen waren zum Versuchsbeginn durchschnittlich 4 - 6 Monate alt und wogen 2,5 – 3,5 kg. Damit fand die Implantation in die noch wachsenden Kaninchen mit einem relativ hohen Regenerationspotential der Schädelkalotte statt. Den Tieren standen ihnen Raufutter, Pellets und Wasser ad libitum zur Verfügung (Ssniff® Spezialdiäten GmbH, Ferdinand-Gabriel-Weg 16, 59494 Soest, Deutschland). Die Tiere wurden einzeln im Käfig gehalten bei einem 12h Tag-Nacht-Rhythmus.

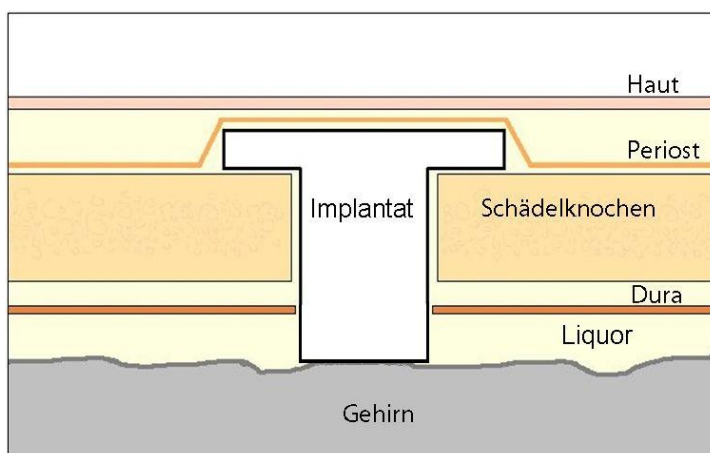


Abbildung 3: Schema des „Jenaer Schädelmodells“

#### 4.2.1 Implantation

Bei der Anästhesie der Tiere wurden Ketamin<sup>®</sup> (40 mg/0,4 ml, verdünnt in 5 ml NaCl, Pharmica GmbH, Linkstraße 10, 10785 Berlin, Deutschland) und Rompun<sup>®</sup> (10 mg/0,2 ml, verdünnt in 5 ml NaCl, Wirkstoff: Xylazin, Bayer Animal Health, GmbH, Kaiser-Wilhelm-Allee 50, 51368 Leverkusen, Deutschland) in die Ohrlöffelvele injiziert. Die Haut des Schädeldachs der Kaninchen wurde rasiert und steril abgedeckt. Der Zugang erfolgte über einen medianen Hautschnitt, wobei die Haut und das Periost seitlich weggeklappt wurden. In die Schädeldecke wurden mit einem Trepanbohrer (Komet Medical, Gebrüder Brasseler GmbH & Co.KG, Trophagener Weg 25, 32657, Lemgo, Deutschland) vier Löcher mit 5 mm Durchmesser eingebracht. Die Löcher entsprachen in ihrer Größe den Implantaten, um diese passgenau einzusetzen. Danach wurde die Dura im Bereich der Bohrlöcher entfernt, um den Kontakt der Materialien mit dem Liquor sowie dem Hirngewebe zu gewährleisten und damit mögliche toxische Wirkungen zu überprüfen (Schneider et al. 2010).

Für die Implantation wurden die Kaninchen in zwei gleich große Gruppen à 9 Tiere unterteilt. Dabei erhielt jedes Versuchstier in den beiden Gruppen zwei Probekörper aus einem Composit, von denen eines ohne mechanische Behandlung in die Schädeldecke eingebracht und das zweite intra-operativ mit einer Fräse leicht angefräst wurde. Damit sollte der Einfluss der angeschliffenen Oberfläche auf die Osseointegration der Materialien untersucht werden. Neben den beiden Composit-Implantaten erhielt jedes Tier zusätzlich ein Kontroll-Implantat aus TCP. Die Tiere in den beiden Gruppen unterschieden sich untereinander in der Polymerkomponente der Composite, wobei jeweils die eine Hälfte der Versuchstiere ein Composit-Implantat aus UM und die andere Hälfte ein Composit-Implantat aus UD zugeteilt bekam. Die Abbildung 4 verdeutlicht dieses Zuteilungsprinzip.

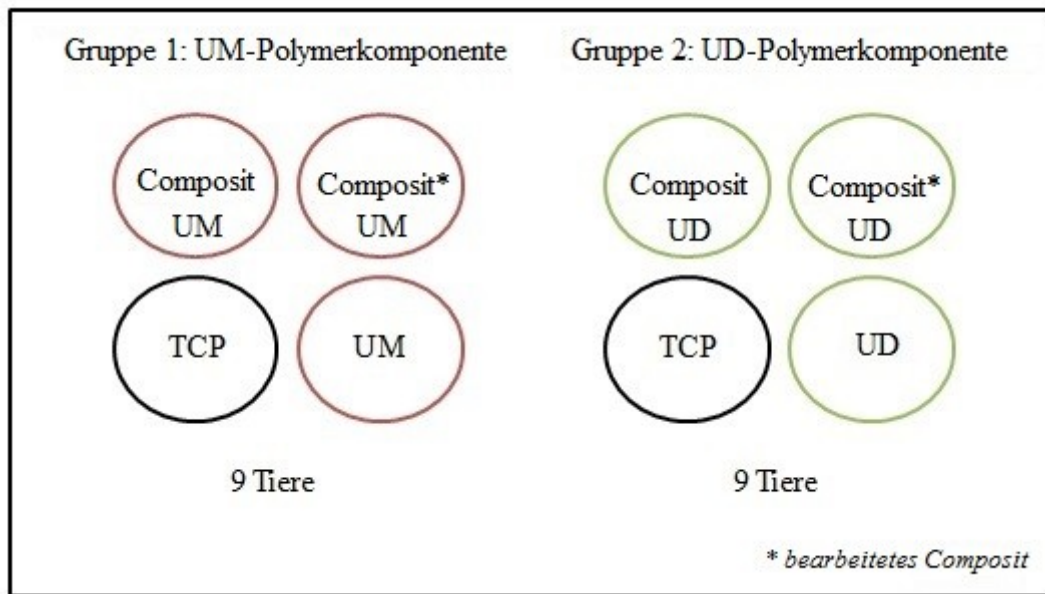


Abbildung 4: Einteilung der beiden Versuchsgruppen

Nach dem Hautverschluss durch resorbierbares Nahtmaterial (Marlin-4/0, Catgut GmbH, Gewebepark 18, 08245 Markneukirchen, Deutschland) und Pflasterspray erhielten die Tiere eine antibiotische Einmaldosis (Baytril<sup>®</sup>, Wirkstoff: Enrofloxacin, Bayer Animal Health GmbH, Kaiser-Wilhelm-Allee 50, 51368 Leverkusen, Deutschland), (Schneider et al. 2010). Eine Übersicht zum Ablauf der Implantation ist in Abbildung 5 gegeben.



Abbildung 5: Implantation der Probekörper, 1) Eröffnung der Schädeldecke, 2) Einbringen der Löcher, 3) Einsetzen der Implantate in Schädelkalotte

#### 4.2.2 Explantation

Nach 3, 6 bzw. 9 Monaten wurden jeweils 6 Tiere (jeweils 3 Tiere aus Gruppe 1 und 2) schmerzfrei mit einem Barbiturat (Pentobarbital-Natrium, Merial GmbH, Am Söldnermoos 6, 85399 Halbergmoos, Deutschland) euthanasiert. Der Zugang erfolgte über einen medianen Hautschnitt, wobei die Haut und das Periost seitlich weggeklappt wurden. Dabei wurde die

Implantatregion makroskopisch beurteilt und das jeweils über den einzelnen Implantaten liegende Bindegewebe abgelöst und in 5 % Formalin fixiert. Mit einer Knochensäge wurde die Schädeldecke mit den Implantaten vom Rest des Schädels gelöst, en bloc entnommen und in Formalin fixiert. Die unter den einzelnen Probekörpern liegende Großhirnrinde wurde ebenfalls als Gewebeprobe in 5 % Formalin (Formaldehydlösung, Otto Fischer GmbH & CO. KG, Kaiserstraße 221, 66133 Saarbrücken, Deutschland) eingebracht. Als Kontrolle diente eine implantatferne Probe der Großhirnrinde. Abbildung 6 zeigt die einzelnen Schritte der Explantation und eine Zuordnung der Implantate.



Abbildung 6: Explantation der Probekörper, 1) Composit unbearbeitet, 2) Composit bearbeitet, 3) Polymer-Kontrolle, 4) TCP-Kontrolle

### 4.3 Anfertigung der histologischen Präparate

#### 4.3.1 Hartgewebehistologie

Die Hartgewebehistologien wurden mittels Trenn-Dünnschliff-Technik nach Donath hergestellt (Donath und Breuner 1982). Das entsprechende Protokoll befindet sich im Anhang unter 9.1.2. Die Implantate mit Knochenproben wurden für mindestens 7 bis 14 Tage in 5 % Formalin fixiert. Die Proben wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert: jeweils drei Tage in 50 %, 70 %, 80 %, 96 % Ethanol, danach zweimal 2 Tage in 100 % Ethanol und anschließend zweimal 2 Tage in Roti<sup>®</sup>-Histol (Carl Roth GmbH & Co.KG, Schoemperlenstraße 3-5, 76185 Karlsruhe, Deutschland). Danach wurden sie für 2 - 3 Tage mit einem Ethanol-Technovit<sup>®</sup> 7200-Gemisch (1:1) und für 3 Tage mit Technovit<sup>®</sup> 7200 (Heraeus Kulzer GmbH, Grüner Weg 11, 063450 Hanau, Deutschland) infiltriert und eingebettet. Technovit<sup>®</sup> ist ein lichthärtender Einbettkunststoff aus Methacrylat. Abbildung 7 zeigt die Einbettung der Implantate in das Technovit<sup>®</sup>. Dann wurden die Proben mit einem EXAKT-Polymerisationsgerät (EXAKT, Apparate Bau GmbH, Norderstedt, Deutschland) für 4 Stunden unter gelbem Licht und anschließend 6 Stunden unter blauem Licht polymerisiert.

Die ausgehärteten Technovit<sup>®</sup>-Blöcke wurden mittels lichthärtendem Transparentkleber (Technovit<sup>®</sup> 7210 VLC, Heraeus Kulzer GmbH, Grüner Weg 11, 63450 Hanau, Deutschland) auf einen Plexiglas-Objektträger geklebt und mit der EXAKT 300-Diamantbandsäge (EXAKT Advanced Technologies GmbH, Robert-Koch-Straße 5, 22851 Norderstedt, Deutschland) zurechtgeschnitten. Die Schnittflächen wurden mit dem EXAKT-Mikroschleifsystem (EXAKT Advanced Technologies GmbH, Robert-Koch-Straße 5, 22851 Norderstedt, Deutschland) plangeschliffen. Anschließend wurden die Präparate auf eine Schichtdicke von 200 - 300 µm geschliffen. Unter Verwendung von diamantbeschichtetem Schleifpapier (Hermes WS flex 18b, Hermes Schleifmittel GmbH & Co. KG, Luruper Hauptstraße 106-122, 22547 Hamburg, Deutschland) mit unterschiedlichen Körnungen (320, 500, 800, 1000, 1200) sowie Polierpapier (4000er Körnung) wurden die Proben bis auf eine Schichtdicke von 5 - 15 µm gebracht. Anschließend wurden die Präparate mit Hämatoxylin-Eosin- oder modifizierter Masson-Goldner-Färbung eingefärbt. Die Färbeprotokolle sind im Anhang unter 9.1.5 und 9.1.6 aufgeführt. Dann wurden die Schnitte über die aufsteigende Alkoholreihe sowie Roti<sup>®</sup>-Histol entwässert und fixiert und mittels Roti<sup>®</sup>-Histokitt (Carl Roth GmbH & Co. KG, Schoemperlenstraße 3-5, 73185 Karlsruhe, Deutschland) eingedeckt.



Abbildung 7: Implantat eingebettet in Technovit<sup>®</sup>

#### 4.3.2 Weichgewebephistologie

Die Bindegewebe- und Hirngewebeproben wurden für mindestens 7 bis 14 Tage in 5 % Formalin fixiert. Die Proben wurden in der aufsteigenden Alkoholreihe für 1-2 Tage entwässert: jeweils eine Stunde in 50 %, 70 %, 90 %, 96 % Ethanol, danach zweimal für 30 min in 100 % Ethanol und zweimal 30 min in Roti<sup>®</sup>-Histol. Dann wurden diese in Schnappdeckelgläsern (Carl Roth GmbH & Co. KG, Schoemperlenstraße 3-5, 76185 Karlsruhe, Deutschland) überführt und zweimal über Nacht mit flüssigem Paraffin (Paraplast

plus, McCormick Scientific, 5918 Evergreen Blvd, St. Louis, MO 63134, United States) bei 60 °C im Wärmeschrank (Memmert GmbH + Co. KG, Äußere Rittersbacher Straße 38, 91126 Schwabach, Deutschland) infiltriert sowie eine Stunde lang flüssig lassen werden. Danach wurden die Proben in Blockschälchen gegossen, ausgehärtet und auf einen Träger (Einbettkassette) aufgebracht. Die Blöcke wurden mittels Mikrotom (Leica-Rotationsmikrotom RM 2125, Ernst-Leitz-Straße 17-37, 35578 Wetzlar, Deutschland) auf eine Schichtdicke von 3 - 10 µm geschnitten. Anschließend wurden die Präparate ins Streckbad (40 °C) überführt, auf einen Objektträger aufgebracht und auf einer Heizplatte getrocknet. Die Präparate wurden mittels Roti<sup>®</sup>-Histol entparaffiniert. Das Herstellungsprotokoll ist im Anhang unter 9.1.3 aufgeführt. Anschließend wurden die Präparate mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und getrocknet. Das entsprechende Färbeprotokoll befindet sich im Anhang unter 9.1.4. Dann wurden die Schnitte wiederum über die aufsteigende Alkoholreihe sowie Roti<sup>®</sup>-Histol entwässert und fixiert und mittels Roti<sup>®</sup>-Histokitt eingedeckt.

#### **4.4 Histomorphometrie der Hartgewebeshistologien**

##### **4.4.1 Lichtmikroskopie**

Für die lichtmikroskopische Untersuchung der Präparate mit Implantat und Knochen wurde das Mikroskop Leitz Diaplan<sup>®</sup> (Leica Microsystems GmbH, Ernst-Leitz-Straße 17-37, 35578 Wetzlar, Deutschland) mit aufmontierter EOS 500D Canon<sup>®</sup> Digitalkamera verwendet (Canon Deutschland GmbH, Europark Fichtenhain A10, 47807 Krefeld, Deutschland). Bilder der Präparate wurden im JPEG-Format (Joint Photographic Experts Group) abgespeichert. Die histologische Beurteilung wurde an den ca. 5 - 15 µm starken Dünnschliffen vorgenommen. Die Schnitte wurden entsprechend der Vorlage des „Jenaer Schädelmodells“ manuell ausgerichtet, sodass die Außenkante des Schädels im Mikroskop oben war. Die Dünnschliffe wurden unter dem Mikroskop durch eine 31,25fache Vergrößerung (Objektiv 2,5fach + Okular 12,5fach) betrachtet. Die Abbildung 8 zeigt die vier verschiedenen Implantate mit umliegenden Knochen und deren Darstellung unter dem Mikroskop.



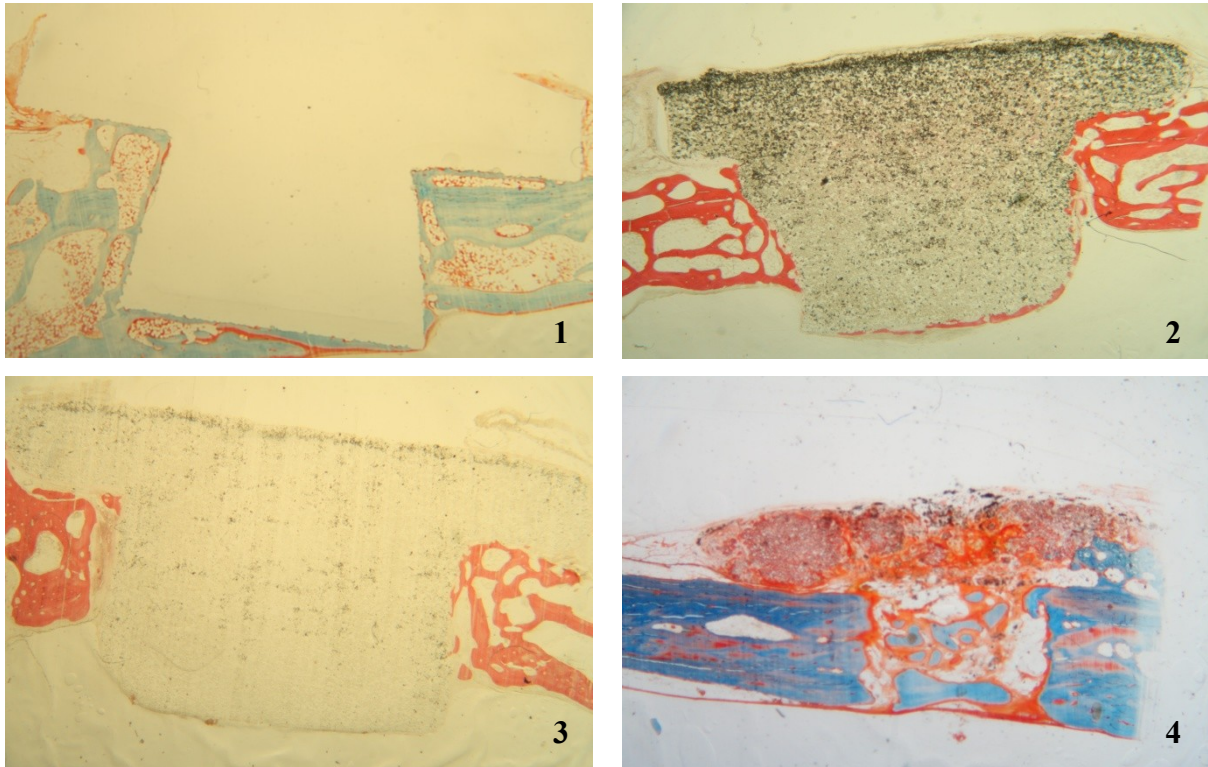


Abbildung 8: 1) Polymer-Kontrolle, 2) Composit bearbeitet, 3) Composit unbearbeitet, 4) TCP-Kontrolle; 31,25fache Vergrößerung, modifizierte MG-Färbung (1 und 4), HE-Färbung (2 und 3)

Für die anschließende Auswertung mit der Software „Histo-Gap“ mussten die angefertigten Schnitte folgende Voraussetzungen erfüllen: Es wurden nur Schnitte mit ausreichender Schichtdicke, Färbung und ohne für die Messung hinderlichen Färbeartefakte verwendet. Des Weiteren musste in einem Präparat das Implantat mit dem umliegenden Knochen vollständig abgebildet sein, da im Bereich der Unterkante des Implantatdeckels bis zur Unterkante des Zylinders morphometrisch gemessen wurde. Zusätzlich wurden nur ausreichend orthogonal im Knochen stehende Probekörper verwendet. Diese Kriterien erfüllten vor allem Schnitte, die unmittelbar durch das Zentrum der Implantate verliefen. Aufgrund dessen konnte für jedes Tier eine unterschiedliche Anzahl an Schnitten ausgewertet werden. Eine genaue Auflistung der Anzahl an histologischen Präparaten für jedes Tier ist im Anhang unter 9.2 dargestellt.

Die Auswertung der Kontroll-Implantate aus TCP war softwareunterstützt nicht möglich, da dieses Material fast vollständig resorbiert wurde und die Knochen-Implantat-Grenze durch starkes Knochenwachstum nicht mehr eindeutig zu erkennen war.

#### 4.4.2 Die erste Histomorphometrie-Software

Zu Beginn dieser Arbeit stand zur Beurteilung der Osseointegration von histologischen Präparaten eine im Biomateriallabor der Klinik für Hals-Nasen- und Ohrenheilkunde Jena entwickelte Histomorphometrie-Software zur Verfügung. Diese Software wurde 2011 als Matlab-Script durch Christoph Greiner-Petter programmiert (Greiner-Petter 2012) und ermöglichte die Messung des Knochen-Implantat-Abstandes in den Hartgewebesthistologien. Für die Verwendung dieses Matlab-Skripts wurde eine Matlab®-Lizenz (MathWorks®, Adalperostraße 45, 85737 Ismaning, Deutschland) genutzt. Die graphische Benutzeroberfläche (GBO) dieses Skripts zeigt Abbildung 9.

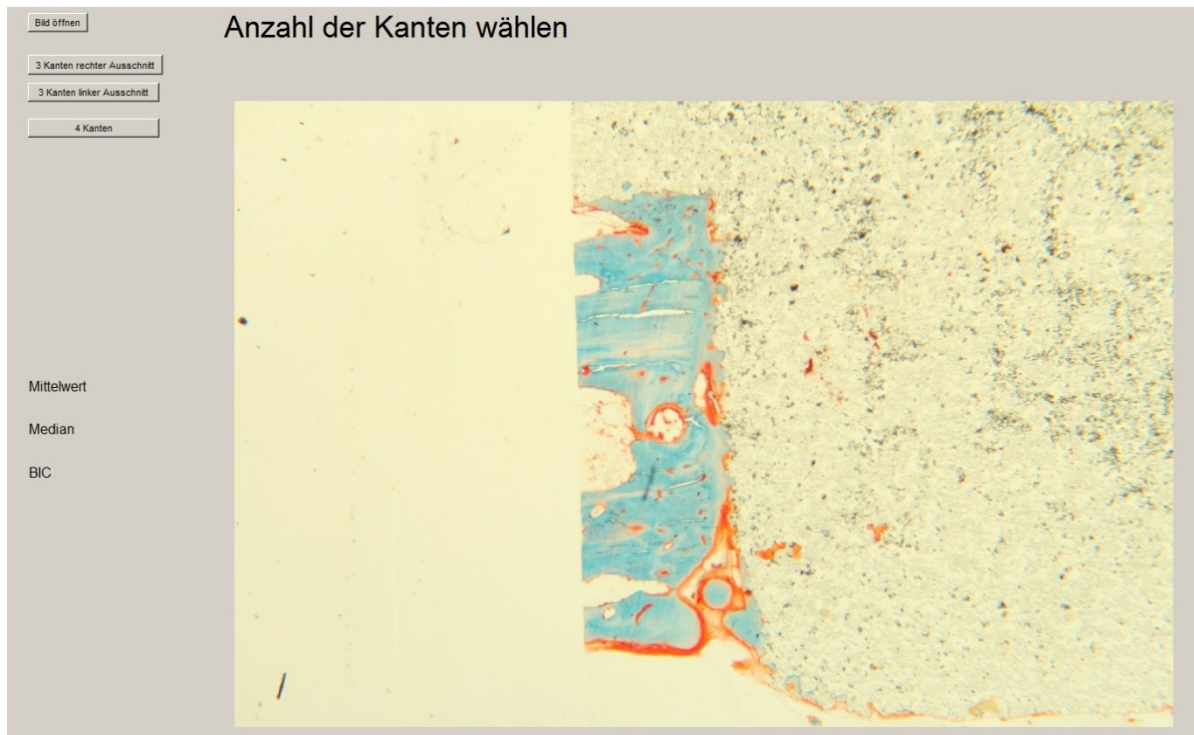


Abbildung 9: Graphische Benutzeroberfläche der Software von 2011

In die Software wurde jeweils ein Foto eines histologischen Präparats der Hartgewebesthistologien geladen. Danach erfolgte eine manuelle Markierung von im Bild sichtbaren Strukturen per Mausklick nach dem folgenden Ablauf: 1. Markierung des Anfangs und des Endes der Messstrecke mit je einer Linie, 2. Festlegung einer Linie für die senkrechte Referenz der Abstände zwischen dem Knochen und Implantat, 3. Markierung der Außenkanten dieser beiden Strukturen im Bereich der festgelegten Messstrecke. Nach Abschluss eines Messvorganges generierte die Software eine Tabelle mit den Messergebnissen (Knochen-Implantat-Abstand in Mikrometern). Ein Beispiel für diese



Tabelle findet sich im Anhang unter 9.6.1. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Funktionalität und Ergonomie dieses Matlab-Skripts anhand von allen im Anhang unter 9.2 zur Verfügung stehenden Präparaten der Hartgewebepreparaten untersucht. Weiterhin wurden der Funktionsumfang, ergonomische Aspekte, mögliche Bedienfehler, Dateneingabe (Messwerte und Randbedingungen) sowie Inhalte und Formatierung der ausgegebenen Daten der Software getestet und evaluiert. Auf dieser Grundlage sollten Verbesserungen, Erweiterungen, standardisierte Abläufe und geeignete Datenstrukturen für eine neue Morphometrie-Software definiert werden.

#### **4.4.3 Die neu entwickelte Morphometrie-Software „Histo-Gap“**

##### **4.4.3.1 Entwicklungsarbeit**

Auf Grundlage der Evaluierung des Matlab-Skripts aus dem Jahr 2011 unter Punkt 4.3 wurde eine neue Morphometrie-Software konzipiert, realisiert und mittels der zur Verfügung stehenden JPEG-Aufnahmen der Hartgewebepreparate evaluiert. Eine genaue Auflistung findet sich im Anhang unter 9.2. Die Entwicklung dieser Software erfolgte im Biomateriallabor der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde Jena in Zusammenarbeit mit Christoph-Greiner-Petter (Master-Student, TU Ilmenau, Deutschland), der für die Implementierung der Neuerungen verantwortlich war. Die Programmierung wurde in der Programmiersprache „C++“ unter Benutzung der „C++“-Klassenbibliothek „Qt“ (Qt Project, Sandakerveien 116, 0484 Oslo, Norwegen) mit der Entwicklungsumgebung „Qt Creator“ vorgenommen (Qt Development Frameworks/ Digia, Valimotie 21, Helsinki, Finnland). Während einer Entwicklungszeit von 9 Monaten wurden fünf Betaversionen erstellt, deren Evaluierung die Voraussetzung für Fehlerkorrekturen war sowie weitere Präzisierungen der Konzepte und Algorithmen für die Software-Implementierung lieferte. Der Ablauf eines Messvorgangs wurde z.T. aus der Software von 2011 übernommen. Die Endversion der Software beinhaltete im Vergleich zu dem Matlab-Skript von 2011 weitreichende Änderungen in der Dateneingabe, -ausgabe und -struktur sowie der graphischen Benutzeroberfläche (GBO). Eine Übersicht zur GBO der Software und dem Format der ausgegebenen Daten ist im Anhang unter 9.3.1 und 9.6.2 aufgeführt.

#### 4.4.3.2 Funktionalität

Die digitalen JPEG-Aufnahmen der Hartgewebhistologien wurden in die Software eingelesen und dabei gleichzeitig automatisch verschiedene Randbedingungen zur Identifizierung der Abbildungen (insbesondere: Datum, Skalierungsfaktor, Benutzer, Softwareversion) erkannt (siehe Tabelle 1). Das Foto eines Präparats wies eine spezifische Vergrößerung auf, weshalb ein Skalierungsfaktor für die exakte Berechnung der Abstände zwischen zwei Strukturen wie z.B. Knochen- und Implantatgrenzen berücksichtigt werden musste. Dieser Faktor konnte manuell eingetragen oder anhand der aufgenommenen Abbildung und ihrer Vergrößerung berechnet werden. Dazu wurde eine Struktur mit einer bekannten Dimension markiert und der Skalierungsfaktor anhand der gemessenen Länge des Objektes errechnet und gespeichert. Danach erfolgte der Messvorgang durch das weitere manuelle Einzeichnen der sichtbaren Strukturen per Mausklick nach dem immer gleichen Ablauf: 1. Markierung des Anfangs und des Endes der Messstrecke mit je einer Linie, 2. Festlegung einer Linie für die senkrechte Referenz der Abstände zwischen dem Knochen und Implantat, 3. Markierung der Ränder dieser beiden Strukturen im Bereich der festgelegten Messstrecke.

Bezogen auf die senkrechte Referenz wurde für die Messstrecke ein definiertes Raster von 100 Messpunkten festgelegt. Dabei markierte ein Messpunkt jeweils eine Position entlang der Messstrecke vom Äußeren zum Inneren der Schädelkalotte, die als „Tiefe\_relativ“ bezeichnet wurde. Darüber hinaus erfolgten die Speicherung der tatsächlichen Abstände zwischen den gesetzten Messpunkten und die Kennzeichnung dieses Parameters als „Tiefe\_absolut“. Nach dem Einzeichnen der Linien fand die Beschriftung und Zuordnung zu den jeweiligen Strukturen im Bild statt. Danach konnten weitere Randbedingungen manuell eingegeben werden, welche ebenfalls in Tabelle 1 aufgeführt sind. Die benötigte Zeitdauer pro Messung betrug ca. drei Minuten. Nach der Verarbeitung aller eingegebenen Daten generierte die Software automatisch eine Tabelle mit den Messergebnissen (Abstände in  $\mu\text{m}$ ) und den Randbedingungen im csv-Format (comma-separated-value). Für jeden Messvorgang wurde automatisch eine eindeutige ID (Identifikator) als fortlaufende Zahl erstellt, welche in jeder Tabellenzeile des Ausgabeformats zugeordnet wurde. Eine genaue Auflistung des Ablaufs einer Messung und die dazugehörige graphische Benutzeroberfläche sind im Anhang unter 9.3.1 und 9.5.1 dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht zum Dateninput, zur Datenstruktur und graphischen Benutzeroberfläche von „Histo-Gap“

	<b>Randbedingungen</b>	<b>Datenstruktur</b>	<b>GBO</b>
<b>Automatische Erkennung</b>	Datum	Breite der Spalten in $\mu\text{m}$	Öffnen verschiedener Fenster
	Softwareversion	Raster von 100 Messpunkten	
	Benutzer	Abstände zwischen den Messpunkten	
	Bildname	ID einer Messung	
	Bildverzeichnis		
	Skalierungsfaktor		
	ID einer Messung		
<b>Manuelle Eingabe</b>	Seite		Skalierungsfaktor
	Projektnummer		Größe anpassen
	Tiernummer		Einzeichnen der Linien
	Position im Tier		Beschriftung der Linien
	Implantatmaterial		Festlegung der Spalten
	Schnittnummer		Randbedingungen
	Verweildauer		
	Methode (2D/3D)		
	Färbung		

#### 4.4.3.3 Anwendung von „Histo-Gap“ auf die Hartgewebhistologien des Versuchs

Von jedem Versuchstier erfolgte mit Hilfe der Morphometrie-Software „Histo-Gap“ die Auswertung der Hartgewebepräparate der Composit-Implantate und der Kontroll-Implantatkörper aus Polymer. Es wurden auf der rechten und linken Seite in den jeweiligen 2D-Abbildungen die folgenden Parameter ermittelt: der Knochen-Implantat-Abstand im Verlauf der Messstrecke und der Anteil des direkten Knochen-Implantat-Kontaktes (bone-implant-contact, BIC). Abhängig von der Qualität der histologischen Schnitte erfolgten pro Implantat durchschnittlich vier bis sechs Messungen. Wenn die Qualität eines Präparats die Auswertung einer kompletten Seite nicht ermöglichte, dann fand dennoch die Beurteilung der

rechten bzw. linken Seite des Objektes statt. Als Region of Interest (ROI) in den Schnitten wurde die Außenkante und die Innenkante der Schädelkalotte festgelegt, wie in Abbildung 10 dargestellt ist. Dies entsprach in der Software dem Anfang (Messpunkt 0) und dem Ende (Messpunkt 100) der Messstrecke. Bereiche mit Knochen außerhalb dieses Messbereichs wurden nicht in die Untersuchung einbezogen.

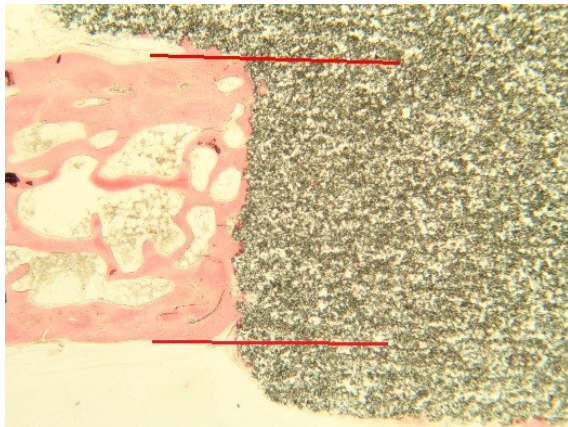


Abbildung 10: Region of Interest der Hartgewebehistologien

Innerhalb der ROI erfolgte die manuelle Markierung des Anfangs (1) und Endes (2) der Messstrecken, der Senkrechten Referenz (3) und des Implantat- und Knochenrandes (4). Dieses Prinzip wird entsprechend der ausgewerteten Schnitte in Abbildung 11 durch die Beschriftung der eingezeichneten Linien verdeutlicht.

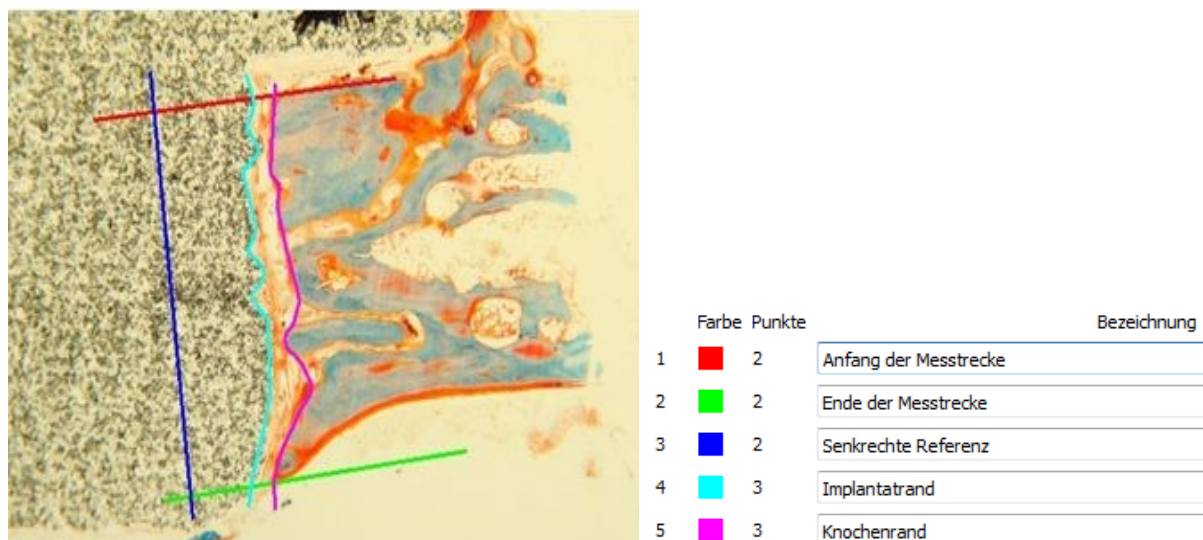


Abbildung 11: Benutzeroberfläche der Software „Histo-Gap“ und Legende zu den Linien

Nach Beendigung jedes Messvorganges erzeugte die Software automatisch zwei Tabellen im csv-Format: eine Tabelle enthielt die Randbedingungen, die zweite die Messergebnisse (Abstände zwischen Knochen und Implantat in Mikrometern). Die eindeutige Zuordnung dieser Daten zum Messvorgang wird durch die von der Software automatisch als fortlaufende Nummer generierte ID sichergestellt. Die statistische Analyse der Daten unter Berücksichtigung der jeweiligen Randbedingungen wurde mit SPSS Statistics® Version 21 (IBM Deutschland GmbH, IBM Allee 1, 71139 Ehningen, Deutschland) durchgeführt. Neben dieser Vorgehensweise erfolgte die die Auswertung der TCP-Implantate mittels der nachfolgenden Methode.

#### **4.4.4 Semiquantitative Beurteilung der Kontroll-Implantate aus TCP**

Die Kontrollen aus TCP wurden auf den Grad an Resorption nach jeweils 3, 6 und 9 Monaten untersucht. Die Beurteilung erfolgte anhand eines nach Brandt et al. modifizierten Scores (Brandt et al. 2010), welcher das Ausmaß der Resorption der TCP-Körper in fünf verschiedene Grade einteilt:

Grad 0 : keine Resorption von TCP

Grad 1: bis zu 10 % Resorption

Grad 2: 25 % Resorption

Grad 3: 50 % Resorption

Grad 4: 75 % Resorption

Grad 5: 100 % Resorption

Darüber hinaus wurde durch die visuelle Beobachtung eine Aussage getroffen, ob die Implantate durch Knochen bzw. Bindegewebe ersetzt wurden und das Ergebnis ebenfalls in einem selbst gewählten Score ausgedrückt:

0: keine Knochenneubildung

1: wenig Knochenneubildung

2: deutliche Knochenneubildung

#### **4.5 Qualitative Beurteilung der Weichgewebshistologien**

Die lichtmikroskopische Untersuchung der Hirn- und Bindegewebspräparate erfolgte anhand von 5-8 µm dicken Serienschnitten unter Verwendung eines Leitz Diaplan Mikroskops (Leica Mikrosystems GmbH, Ernst-Leitz-Straße 17, 35578 Wetzlar, Deutschland). Dabei wurde wiederum eine EOS 500D Canon® Digitalkamera (Canon Deutschland GmbH, Europark Fichtenhain A10, 47807 Krefeld, Deutschland) auf das Gerät montiert, alle angefertigten Weichgewebsschnitte durch eine 500fache Vergrößerung (Objektiv 40fach + Okular 12,5 fach) betrachtet und Bilder der Präparate im JPEG-Format angefertigt. Für jedes Tier standen mehrere Weichgewebssproben zur Verfügung. Um diese zu beurteilen, wurden drei ROIs (Region of Interest) definiert: 1. Hirngewebsprobe unterhalb des Implantats, 2. Hirngewebs-Kontrollprobe von implantatfernen Bereichen, 3. Schicht aus bedeckenden Bindegewebe auf dem Implantat. In diesen Bereichen fand die Evaluation der Entzündungs- und Fremdkörperreaktionen für jedes Präparat anhand von zwei repräsentativen Schnitten mit möglichst hoher Qualität, ausreichender Färbung, Schichtdicke und Unversehrtheit statt. Die erhobenen Daten wurden nach einem eigenen Score, welcher z.T. auf einer Einteilung nach Santos basierte (Santos et al. 2012), ausgewertet. Dabei wurde die Anzahl an Granulozyten und Fremdkörperriesenzellen (FKRZ) numerisch erfasst und mit Hilfe des folgenden Scores bewertet:

0: keine Entzündungs- und Fremdkörperreaktion

1: geringe Entzündungs- und Fremdkörperreaktion, 1-10 Zellen

2: starke Entzündungs- und Fremdkörperreaktion, > 10 Zellen

## 4.6 $\mu$ CT

### 4.6.1 Aufbau eines herkömmlichen $\mu$ CT-Geräts

Herkömmliche Kleingeräteanlagen bestehen im Wesentlichen aus einer X-ray-(Röntgenstrahl)Quelle, einem drehbaren Objektisch und einem Detektor, wie Abbildung 12 schematisch zeigt.

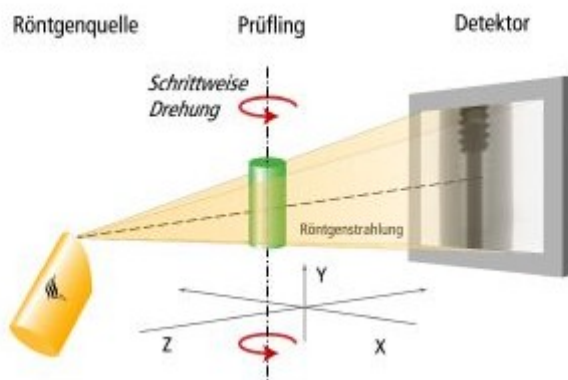


Abbildung 12: Schematischer Aufbau eines herkömmlichen  $\mu$ CT-Geräts (Neuser und Sommerfeld 2007)

Während eines Scanvorgangs werden die Röntgenstrahlen durch die Röntgenquelle erzeugt und zunächst in einem Punkt fokussiert. Von diesem Punkt aus durchlaufen die Strahlen die Probe, welche sich auf dem Objektisch befindet, kegelförmig und werden je nach Geometrie, chemischer Zusammensetzung, Röntgendichte des Materials und Röntgenstrahlenergie abgeschwächt (Schambach et al. 2010, Handels et al. 2011). Da die Probe während einer Aufnahme schrittweise um  $360^\circ$  rotiert, werden von einem Objekt viele Einzelaufnahmen erzeugt. Nach dem Durchlaufen des Objekts, wird der restliche Teil der Strahlen von einem Detektor erfasst, welcher mit einem Computer verbunden ist und bei jedem Schritt der Rotation ein zweidimensionales Abbild der Probe erstellt. Mit Hilfe einer geeigneten Verarbeitungssoftware werden die 2D-Bilder in einen dreidimensionalen Datensatz umgerechnet und gespeichert (Feldkamp et al. 1984, Ritman 2011). Die Auflösung der Datensätze wird in diesen Geräten insbesondere durch den Abstand der Röntgenquelle vom Objekt, durch die Pixelzahl des Detektors und durch die Fokusgröße des Röntgenstrahls bestimmt. Hierbei nimmt der Photonenfluss der Röntgenstrahlen mit zunehmenden Abstand ab und begrenzt u.a. dadurch die Auflösung (Handels et al. 2011). In den zurzeit verfügbaren herkömmlichen  $\mu$ CT-Geräten wird eine Auflösung von ca.  $0,5\ \mu\text{m}$  erreicht (Brunke 2008).

Die erzeugten 3D-Datensätze werden anschließend mit einer geeigneten Bildverarbeitungssoftware visualisiert, bearbeitet und die verschiedenen Materialien durch den Vorgang der Segmentierung voneinander getrennt.

#### **4.6.2 Scanbedingungen der $\mu$ CT-Aufnahmen des Versuchs**

Nach dem Einbetten in Technovit<sup>®</sup> und vor dem Zerlegen der Kunststoffblöcke wurden die Gewebsblöcke à 4 Implantaten unter einheitlichen Bedingungen computertomographisch untersucht. Die hochauflösenden  $\mu$ CT-Scans wurden am Fraunhofer ENAS Chemnitz (Fraunhofer-Institut für Elektronische Nanosysteme ENAS, Technologie-Campus 3, 09126 Chemnitz, Deutschland) mit einem „nanotom s“  $\mu$ CT-Scanner (GE Sensing & Inspection Technologies GmbH/ phoenix/ x-ray, Niels-Bohr-Straße 7, 31515 Wunstorf, Deutschland) durchgeführt. Dieser enthielt eine 180 kV/ 15W high-power nanofocus Röntgenröhre. Eine Zusammenfassung der  $\mu$ CT-Scanbedingungen ist in Tabelle 2 dargestellt. Die erstellten 3D-Datensätze wurden im DICOM-Format (Digital Imaging and Communications in Medicine) gespeichert und besaßen eine Größe von jeweils ca. 4 GB.

Tabelle 2: Scanbedingungen der  $\mu$ CT-Aufnahmen

##### Auflösung:

Voxelauflösung	14 $\mu$ m
Anzahl der Bilder	1440
Bildweite	2284 Pixel
Bildhöhe	1800 Pixel
Voxelgröße	< 0,5 $\mu$ m

##### Detektor:

Typ	ham-c7942
Belichtungsdauer	750 ms

##### Röntgenstrahl:

Spannung	60 kV
Stromstärke	300 $\mu$ A
Filter	keiner



Eine zweidimensionale Übersichtsaufnahme eines Beispieldatensatzes wird in Abbildung 13 gezeigt. In diesem virtuellen Schnitt des 3D-Datensatzes sind die gescannten Materialien mit ihrer unterschiedlichen Röntgendichte dargestellt. Die Röntgendichte der Materialien spiegelt sich in den Grauwerten der 3D-Datensätze (Helligkeits- bzw. Intensitätswerte der Voxel) wider und ermöglichte die optische Unterscheidung der verwendeten Materialien. Röntgendichte Strukturen (grau im Bild, helle Grauwerte) sind die im Scanvolumen enthaltenen calciumphosphathaltigen Objekte, wie die beiden TCP-Polymer-Composit-Implantate, das Kontroll-Implantat aus TCP und der umliegende Knochen. Calciumphosphatfreie Materialien mit geringer Röntgendichte (schwarz im Bild, dunkle Grauwerte) sind das Einbettungsmedium (Polymer), das Kontroll-Implantat aus Polymer und das eingebettete Weichgewebe.

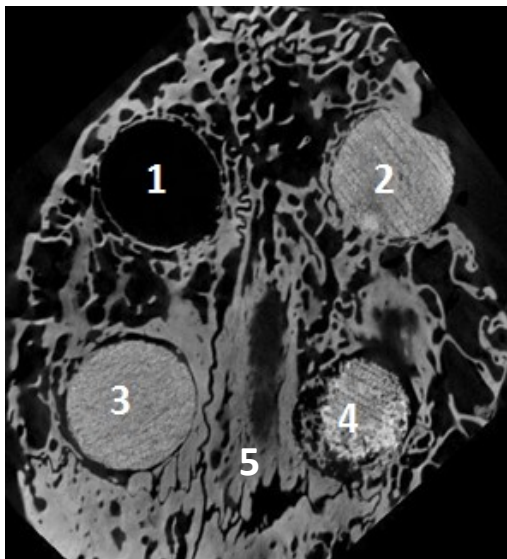


Abbildung 13: Übersicht der Implantate im CT-Scan, mit 1) Polymer-Kontrolle, 2) Composit bearbeitet, 3) Composit unbearbeitet, 4) TCP-Kontrolle, 5) Knochen

Die Untersuchung der Osseointegration der 3D-Datensätze erfolgte anhand der TCP-Polymer-Composit-Implantate. Die Kontrollkörper aus dem TCP kamen für diese Auswertungsmethode aufgrund der Resorption nicht in Frage. Die Kontroll-Implantate aus Polymer konnten durch ihre geringe Röntgendichte im  $\mu$ CT-Scan nicht vom umgebenden Einbettungsmedium abgegrenzt werden.

## **4.7 Visualisierung und Bearbeitung der 3D-Datensätze mit Hilfe von Avizo® Fire 6.3**

### **4.7.1 Grundlagen**

#### **4.7.1.1 Bildformat**

Ein Bildformat kann als 2D- oder 3D-Bildfolge dargestellt werden. Dabei besteht ein 2D-Bild aus Bildpunkten bzw. Pixeln (picture element), welche durch Grauwerte die Helligkeit bzw. Röntgendichte eines Bildes repräsentieren. Die Anzahl der Pixel bestimmt die Auflösung eines Bildes. Ein 3D-Datensatz besteht aus einzelnen zusammengesetzten zweidimensionalen Bildern und dessen Volumen wird durch Voxel (volume elements) dargestellt (Handels 2009a).

#### **4.7.1.2 Bildvorverarbeitung**

Durch die Bildvorverarbeitung kann die Qualität medizinischer Bilddaten verbessert, der verwertbare Informationsgehalt erhöht und die Bildobjekte besser voneinander abgegrenzt werden (Bouxsein et al. 2010, Jähne 2012). Daher sollen durch die Bildvorverarbeitung beispielsweise der Rauscheinfluss reduziert, Artefakte beseitigt, der Bildkontrast verbessert oder die Bildgröße normiert werden. Dazu stehen z.B. Glättungs- und Kantenfilter zur Verfügung (Handels 2009a).

##### *Glättungsfilter*

Glättungsfilter dienen der Rauschunterdrückung (noise suppression) und Bildglättung (image smoothing), indem sie die lokalen Variationen der Bildfunktionswerte reduzieren und die Homogenität dieser Bilddaten erhöhen. Zu den Glättungsfiltern gehören z.B. der Mittelwert-, Gauß- und Medianfilter.

##### *Kantenfilter*

Kantenfilter (edge operator) dienen der Kennzeichnung von Kanten. Als Kante wird in einem zweidimensionalen Bild eine starke lokale Veränderung der Bildfunktion mit hohem Kontrast

bezeichnet (Handels 2009a). Zu den Kantenfiltern gehören z.B. der Sobel- und der Laplace-Filter.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die 3D-Datensätze der Implantate mit dem Gauß- und dem Sobel-Filter vorbearbeitet, um die Ausgangsbedingungen für eine nachfolgende Segmentierung zu verbessern (Handels 2009a, Jähne 2012).

#### **4.7.1.3 Segmentierung**

Bei der Segmentierung werden den verschiedenen Bildpunkten/ Pixeln eines Datensatzes unterschiedliche Homogenitäts-Kriterien zugeordnet und somit Bildobjekte wie Knochen und Implantat voneinander differenziert. Die Segmentierung ermöglicht nachfolgend die Analyse von diesen Daten und Bestimmung von Parametern wie z.B. Trabekelvolumen, Knochen-Implantat-Kontakt und Knochendichte (Bankman 2009, Handels 2009c, Boussein et al. 2010, Jähne 2012). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden Segmentierungsprinzipien genutzt: das Schwellenwertverfahren (Thresholding), die Kantenbasierte Segmentierung (Watershed-Segmentierung) und das Region Growing.

#### **4.7.2 Die 3D-Software Avizo® Fire 6.3**

Die 3D-Datensätze (Oberflächen- und Volumendatensätze) des ausgewählten TCP-Polymer-Composit-Implantats wurden anhand der Software Avizo® Fire Version 6.3 (FEI, Visualization Sciences Group, Wernigeroder Straße 129, 40210 Düsseldorf, Deutschland) visualisiert und bearbeitet. Dabei erfolgte insbesondere die Beurteilung der Möglichkeiten zur Abgrenzung der Composit-Implantate von ihrer Umgebung mittels semiautomatischer Segmentierung der 3D-Datensätze. Diese war Voraussetzung für eine automatische Auswertung des Knochen-Implantat-Kontakts (bone-implant-contact, BIC) und des Knochen-Implantat-Abstandes in dem 3D-Datensatz. Ebenfalls wurde die Software durch Entwicklung eines Algorithmus zur Erstellung und zum Export von virtuellen 2D-Schnitten genutzt. Ein Überblick zur Funktionalität und zur graphischen Benutzeroberfläche ist im Anhang unter 9.3.2 und 9.5.2 dargestellt.

#### 4.7.2.1 Visualisierung der 3D-Datensätze

Für die Vorbereitung der Bearbeitung der Composit-Implantate wurden die einzelnen zu untersuchenden Implantate (jeweils zusammen mit dem umliegenden Gewebe) mit dem Modul „Lattice Access“ als Teilvolumina aus dem ursprünglichen 3D-Datensatz herausgeschnitten und als separate 3D-Datensätze gespeichert. Dabei wurde der Umriss des ausgewählten Bereichs mit dem Knochen und Implantat durch eine virtuelle Box markiert, wie die Abbildung 14 verdeutlicht.

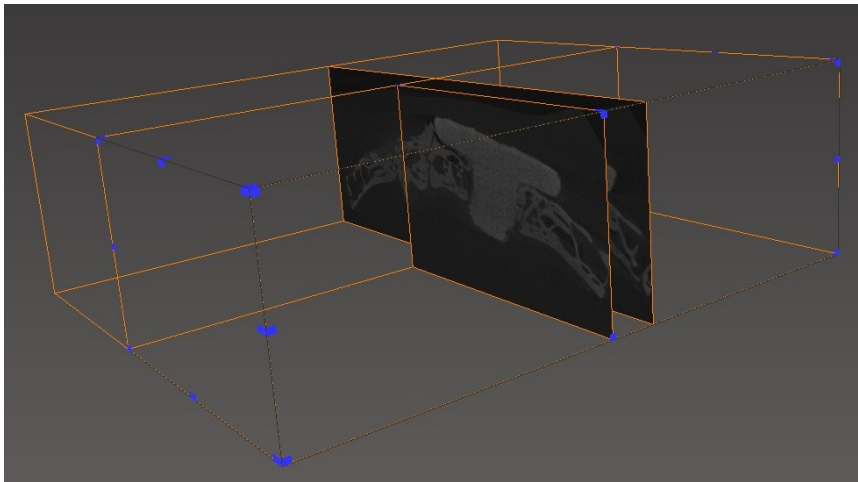


Abbildung 14: Darstellung eines herausgeschnittenen Bereichs im 2D-Schnittbild mit der Funktion „Lattice Access“

Die in dem bogenförmig gekrümmten Schädelknochen integrierten Implantate waren ursprünglich nicht einheitlich ausgerichtet. Durch eine Transformation des Koordinatensystems des Teilvolumens mit Hilfe des Moduls „Apply-Transform“ wurden sie in eine „aufrechte Orientierung“ gebracht (Außenseite des Schädeldachs nach oben, Rotationsachse des Implantats parallel zur Z-Achse des Koordinatensystems). Die anschließende Betrachtung der 3D-Datensätze erfolgte mittels der Module „Bounding Box“, „Ortho-Slice“ und „Oblique-Slice“. Mit diesen Modulen wurden die äußeren Abgrenzungen des zu visualisierenden Volumens gekennzeichnet, ein virtueller 2D-Schnitt durch den 3D-Datensatz gelegt und eine geeignete Position des Schnittes sowie Helligkeit und Kontrast des Bildes eingestellt. Abbildung 15 zeigt einen 2D-Schnitt durch den Gewebsblock mit den vier Implantaten sowie Abbildung 16 einen 2D-Schnitt durch ein einzelnes Implantat.

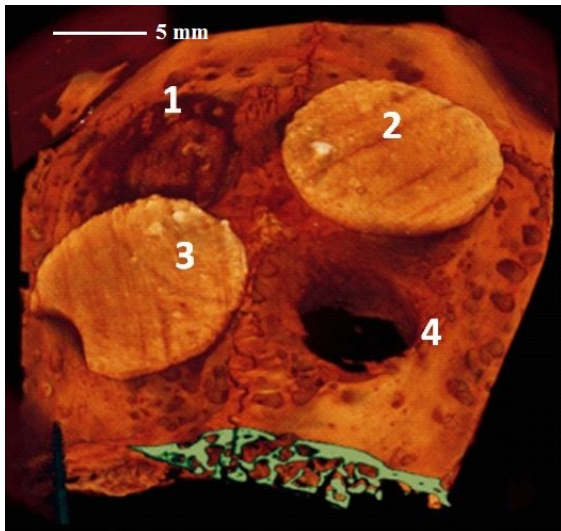


Abbildung 15: Aufnahme eines Volumendatensatzes der Implantate, 1) TCP-Kontrolle, 2) Composit unbearbeitet, 3) Composit bearbeitet, 4) Polymer-Kontrolle

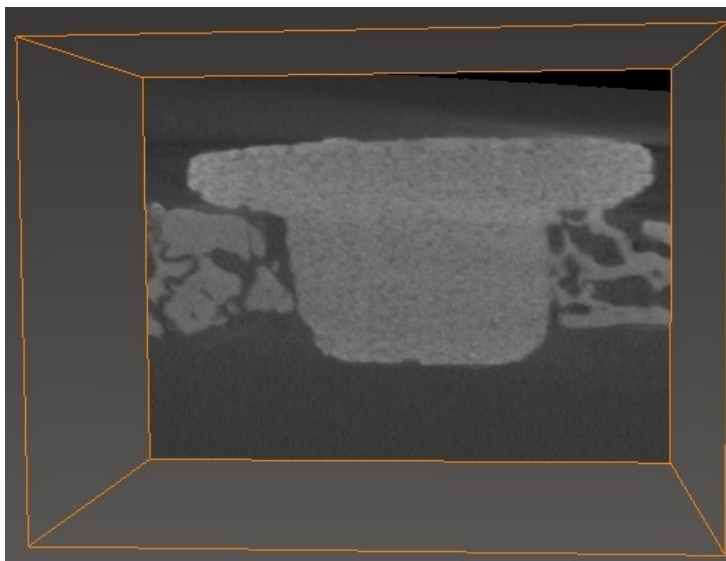


Abbildung 16: „Ortho-Slice“ durch den 3D-Datensatz eines Implantats, gelb markierte „Bouding Box“

#### 4.7.2.2 Segmentierung der $\mu$ CT-Datensätze

Die in aufrechte Position gebrachten und visualisierten Implantate sollten anschließend auf effiziente Weise (d.h. automatisch bzw. semiautomatisch) vom umgebenden Knochen segmentiert werden. Dazu wurden die folgenden in AvzioFire<sup>®</sup> 6.3 implementierten Segmentierungsprinzipien anhand der vorliegenden Datensätze getestet: A) Festlegung von Schwellenwerten, B) Kantenerkennung, C) Kombination aus Schwellenwert und Kantenerkennung sowie D) Region Growing.

A) Für die Evaluierung des Segmentierungsprinzips **“Schwellenwert“** wurde das Modul „Threshold-Segmentation“ eingesetzt. Dieses Verfahren gehört zu den pixelorientierten Verfahren und trennt die zu einem Bildobjekt gehörenden Pixel anhand zweier Schwellenwerte „t unten“ und „t oben“ voneinander. In der Software wurden alle Pixel, deren Grauwerte in dem definierten Bereich lagen, farblich markiert. Die Festlegung geschah individuell durch den Nutzer und interaktiv mit Hilfe eines Histogramms (Handels 2009c). Um lokale Helligkeitsunterschiede, die durch Bildrauschen und ähnliche Artefakte verursacht werden auszugleichen, wurde die Anwendung geeigneter Filter (Gauß-Filter und Median-Filter) vor der Schwellenwert-Segmentierung getestet. Der Gauß-Filter orientiert sich in seiner Form an der zweidimensionalen Gauß’schen Normalverteilung, welche in den Bildern den Maskenmittelpunkt zentriert und dadurch das Bildrauschen vermindert. Bei einem Medianfilter werden die Grauwerte der Pixel nacheinander aufsteigend sortiert und der an mittlerer Position stehende Bildfunktionswert als Median ermittelt. Dadurch werden lokale Ausreißer beseitigt und Objektkanten bleiben erhalten (Handels 2009b, Suetens 2009, Jähne 2012).

B) Zur Testung des Prinzips **“Kantenerkennung“** wurde das Modul „Watershed-Segmentation“ eingesetzt. Dabei wird die Kante eines Objektes durch den lokalen Maximalwert eines Pixels charakterisiert. Bei der Watershed-Segmentierung (Wasserscheide) wird ein Ausgangspunkt gewählt und die Funktion tastet die umliegenden Pixel bis zum Erreichen einer „Wasserscheide“ ab. Eine Wasserscheide ist durch das Vorhandensein von Pixeln mit hellen Grauwerten als Gipfel und Pixeln mit dunklen Grauwerten das Tal definiert und kommt typischerweise im Bereich von hohen Kontrasten wie z.B. Kanten vor (Handels 2009c, Jähne 2012). Um die Segmentierung nach dem Kantenerkennungsprinzip zu erleichtern wurde ein „Edge-Detection-Sobel“ -Filter verwendet. Dieser Filter nutzt zur Rauschreduzierung die Technik des Gauß-Filters aus, in dem eine Gauß-Wichtung der Pixelwert-Differenzen zur Kantenkennzeichnung verwendet wird (Handels 2009b).

C) Mit Hilfe des Moduls „2D-Histogramm-Segmentation“ wurde die Segmentierung anhand der **Kombination** von Helligkeits-Schwellenwerten und Kantenerkennung getestet.

D) Für die Evaluierung des Prinzips **“Region Growing“** (Bereichswachstumsverfahren) wurde das Modul „Label-Field“ verwendet. Dabei wird zunächst ein Pixel dem gewünschten Bildobjekt als Saatpunkt zugeordnet. Der Algorithmus tastet anschließend die Nachbarpixel dieses Punktes ab und fügt diese, wenn sie den festgelegten Homogenitätskriterien entsprechen, zu dem Saatpunkt hinzu. Wenn es keine homogenen Nachbarpixel mehr gibt, stoppt der Algorithmus. Durch das Region Growing entstehen zusammenhängende Regionen

eines Bildobjektes, wobei durch Kombination mit einem Sobel-Filter unerwünschte Übergänge zwischen zwei Regionen vermieden werden können. Das Ergebnis dieses Verfahrens hängt in hohem Maße von dem gewählten Homogenitätskriterium ab (Bankman 2009, Handels 2009b, Jähne 2012). In dem vorhandenen Modul der Software erfolgte mit dem Tool „Brush“ die Auswahl eines Saatpunktes im Material „Implantat“. Während der fortschreitenden Abtastung der jeweiligen Nachbapixel durch diese Funktion wurden die untersuchten Pixel dem mit dem Saatpunkt markierten Material hinzugefügt, wenn sie den festgelegten Homogenitätskriterien entsprachen.

Auf der Grundlage dieser Evaluation der verschiedenen Segmentierungsprinzipien wurde ein Algorithmus zur Erstellung von virtuellen 2D-Schnitten aus dem 3D-Datensatz eines Implantats entwickelt.

### **4.7.3 Export von virtuellen 2D-Schnitten aus den $\mu$ CT-Datensätzen und Auswertung mittels „Histo-Gap“**

#### **4.7.3.1 Grundlagen**

Um die Osseointegration der Datensätze zu beurteilen, erfolgte die Erstellung von definierten Serien virtueller Schnitte eines ausgewählten 3D-Datensatzes eines nicht bearbeiteten Composit-Implantats mit einer Verweildauer von 9 Monaten. Dazu wurde ein Algorithmus entwickelt und die dafür notwendigen Skripte „cylinder iv“ und „Rotate Slice“ (Westenberger 2012) in Avizo® Fire 6.3 implementiert. Die Skripte wurden in der Open Source-Skriptsprache TCL (Tool Command Language) programmiert. Mit diesem Algorithmus können Serien virtueller Schnitte in frei definierbaren Winkelabständen „tortenschnittartig“ durch eine vorgegebene Rotationsachse exportiert werden. Die Methode ist damit insbesondere für die Definition und den Export virtueller Schnitte aus 3D-Datensätzen der hier untersuchten Implantate sowie anderer rotationssymmetrischer Objekte, wie z.B. Schrauben und Zylinder geeignet. Die erstellten virtuellen 2D-Schnitte wurden im JPEG-Format erstellt und mit Hilfe der Software „Histo-Gap“ ausgewertet. Der genaue Ablauf ist im Anhang unter 9.4 anhand eines Beispieldatensatzes dargestellt.

#### 4.7.3.2 Auswertung der virtuellen 2D-Schnitte

Die virtuellen Schnitte der Implantate wurden ebenfalls mit der Software „Histo-Gap“ auf die Osseointegration untersucht und die zu den Hartgeweben identischen Parameter des Knochen-Implantat-Abstands und Knochen-Implantat-Kontakts ermittelt. Dabei erfolgte die Messung dieser Komponenten nach demselben Messablauf und in derselben ROI, wie bei den 2D-Hartgewebephistologien. Diese ROI ist in Abbildung 17 dargestellt. Der Knochen und das Composit-Implantat sind calciumphosphathaltige Materialien und wiesen daher ähnliche Grauwerte auf, wodurch die Abgrenzung bei direktem Knochen-Implantat-Kontakt schwierig war. Daher wurde direkt an den Implantaten liegender Knochen ab einer minimalen Breite von 100 µm als Knochensaum interpretiert.

Nach jedem Messvorgang wurden ebenfalls automatisch je eine Tabelle mit den Randbedingungen der Messung bzw. Messergebnissen im csv-Format erzeugt und durch die ID gekennzeichnet.

Auch diese beiden Tabellen wurden miteinander kombiniert und anschließend mit der Software IBM SPSS Statistics® Version 21 für Windows (IBM Deutschland, IBM-Allee 1, 71139 Ehningen, Deutschland) statistisch analysiert sowie mit den Ergebnissen der Hartgewebephistologien desselben Implantats verglichen.

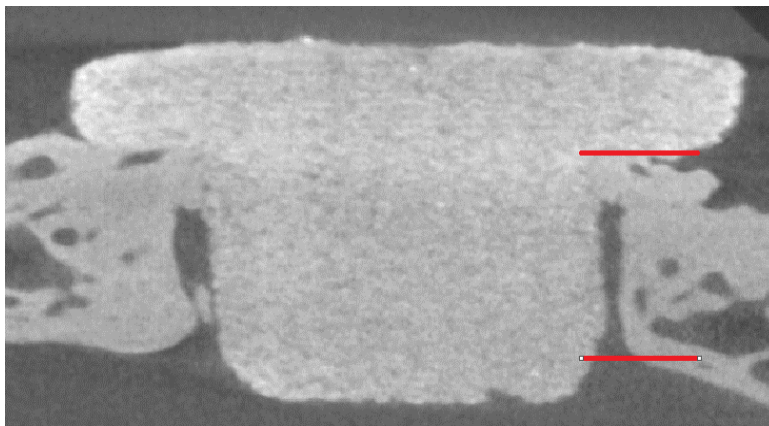


Abbildung 17: ROI in einem virtuellen 2D-Schnitt



## 4.8 Statistische Auswertung

### 4.8.1 Aufbereitung der erhobenen Daten

Für die statistische Auswertung der mit „Histo-Gap“ erhobenen morphometrischen Daten wurden die automatisch im csv-Format generierten Auswertungstabellen weiter modifiziert. Die von „Histo-Gap“ erzeugten csv-Tabellen mit den Messergebnissen enthielten Punkte als Dezimaltrennzeichen, die in einem ersten Konvertierungsschritt durch Kommas ersetzt wurden. Die Informationen zu den Randbedingungen wurden größtenteils als Wörter (z.B. HE-Färbung, 2D-Methode, bearbeitetes Composit) definiert. Als Voraussetzung für die flexible Auswertung mit SPSS Statistics® wurde ein Codierungssystem erstellt, bei dem diese Randbedingungen durch eindeutig zugeordnete Zahlen repräsentiert werden. Dieses Codierungssystem ist im Anhang unter 9.7 aufgelistet. In einem zweiten Konvertierungsschritt wurden die betreffenden Wörter in den csv-Tabellen entsprechend dieser Codierung durch die zugeordneten Zahlenwerte ersetzt. Diese Modifikationen erfolgten mit dem Text-Konverter „konvert 5.0“ (Stefan Vilvo Software, Düren) jeweils gleichzeitig bei mehreren csv-Tabellen. Als Resultat dieser Konvertierungsschritte konnten aus einer Anzahl von Ergebnissen morphometrischer Messungen in Form von csv-Dateien, die mit „Histo-Gap“ erzeugt worden waren, jeweils zwei für die Auswertung mit SPSS Statistics® bereinigte csv-Dateien generiert werden. Dies erfolgte mit Hilfe einfacher Befehlszeilenkommandos nach dem folgenden Schema:

```
copy *.csv concatenated.csv  
type tabellenkopf.txt > cleaned-for-SPSS.csv  
type concatenated.csv | find /v "unique" | sort >> cleaned-for-SPSS.csv.
```

Eine dieser beiden Dateien enthielt jeweils die relevanten experimentellen Randbedingungen aller Messungen, die zweite Datei enthielt alle morphometrischen Messwerte. Die eindeutige Zuordnung zu den einzelnen Messungen wurde dabei durch die in jeder Zeile dieser Tabellen enthaltene Identifikationsnummer der jeweiligen Messung gewährleistet.

#### 4.8.2 Beschreibung der statistischen Methode

Die erhobenen Daten wurden mit der Software IBM SPSS Statistics® Version 21 für Windows (IBM Deutschland, IBM-Allee 1, 71139 Ehningen, Deutschland) statistisch analysiert. Zur Testung der Normalverteilung der Daten wurde zunächst eine graphische Häufigkeitsverteilung der Messpunkte durchgeführt, wie in Abbildung 18 dargestellt ist. Dieses Diagramm stellt die Verteilung der Messpunkte bezogen auf den Knochen-Implantat-Abstand dar. Anhand dessen zeigte sich deutlich, dass die Daten nicht normalverteilt, sondern extrem linksschief waren. Daher wurde kein spezifischer Test auf Normalverteilung angeschlossen.

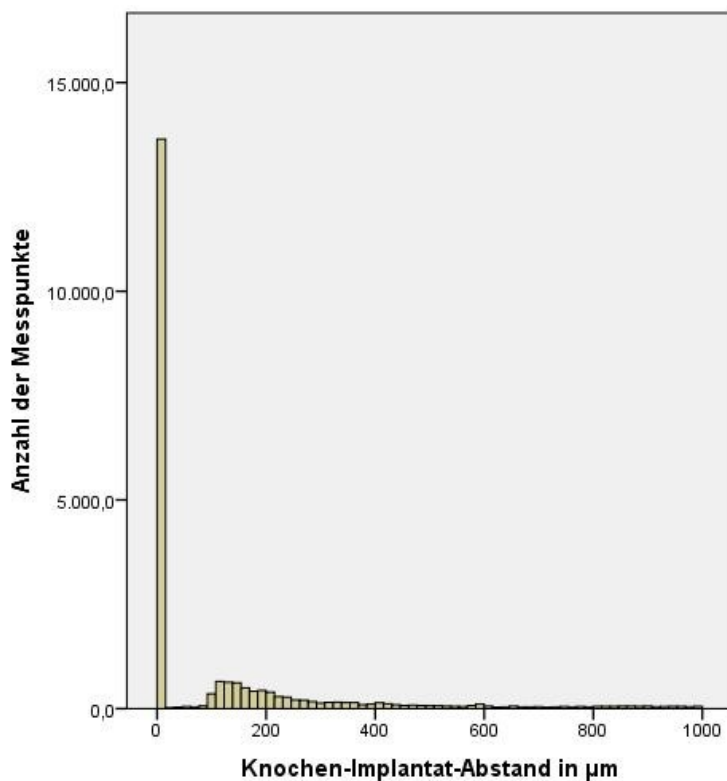


Abbildung 18: Verteilung der Daten

Der BIC der Implantate wurde anschließend aus dem Knochen-Implantat-Abstand berechnet. Für die statistische Beurteilung der BICs der Hartgewebekategorien und den Vergleich von generierten 2D- und 3D-Daten wurde das Modell der „Verallgemeinerten Schätzungsgleichungen“ (Burton et al. 1998, Ziegler et al. 1998, Keller 2003) durchgeführt. Mit diesem Verfahren erfolgte die Untersuchung der Längsschnittdaten bestehend aus den folgenden „Ebenen“: Polymerkomponenten UM oder UD über die gesamte Verweildauer,

nach 3, 6 und 9 Monaten sowie die Beurteilung der Implantatmaterialien in den beiden Gruppen. Dabei lieferten diese „Verallgemeinerte Schätzungsgleichungen“ (GEE, Generalized Estimating Equations) nach Festlegung der Variablen und Kovariablen für die verschiedenen Ebenen die jeweiligen geschätzten Mittelwerte des Modells, in diesem Fall die des geschätzten BICs. Durch die Zusammenfassung aller gemessenen BICs der Hartgewebepathologien in diesem Modell können die Daten miteinander verglichen werden. Für die Erwartungswerte wurde das 95%-Konfidenzintervall angegeben und eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  als statistisch signifikant angesehen.

Um die Verteilung der Stichprobe darzustellen, wurde ein Boxplot-Diagramm angewendet. Dieses lieferte Daten zu den folgenden Lagemaßen: Mittelwert, Median, Quartile, Minimum, Maximum und den Streuungsmaßen wie z.B. Spannweite und Quartilsabstand.

Weiterhin wurde eine univariable lineare Regression zur Untersuchung des Einflusses der Position entlang des Schädelknochens auf das Maß an BIC durchgeführt. Hierbei wurden die vorhandenen Messergebnisse aller Hartgewebepathologien der Materialien einbezogen. Es wurde der Regressionskoeffizient B für die Position auf dem Schädelknochen sowie der Korrelationskoeffizient r nach Pearson und der Determinationskoeffizient  $r^2$  für die Stärke der Korrelation betrachtet. R gab hierbei an, wie stark der Zusammenhang zwischen den beiden Variablen war.  $R^2$  sagte bei zwei Variablen A und B aus, wie viel der Varianz von Variable A durch Variable B erklärt wurde und wie viel der Varianz von Variable A durch andere Faktoren bedingt war. Hohe Werte von r und  $r^2$  zeigten hierbei einen großen Zusammenhang an.

## **5 Ergebnisse**

### **5.1 Entwicklung der Morphometrie-Software „Histo-Gap“**

Als eine Grundlage der vorliegenden Arbeit stand eine histomorphometrische Software zur Messung der Abstände zwischen dem Knochen und Implantat in den Abbildungen histologischer Präparaten zur Verfügung. Dieses Programm wurde im Jahr 2011 im Biomateriallabor der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde Jena durch Christoph Greiner-Petter von der TU Ilmenau entwickelt (Greiner-Petter 2012). Der Funktionsumfang und die ergonomischen Parameter dieser Software genügten den Anforderungen dieser Promotion nicht, weshalb eine neue Morphometrie-Software zusammen mit demselben Programmierer entwickelt und im Rahmen dieser Dissertation evaluiert wurde. Mit dieser neuen Software können nicht nur histomorphometrische Messungen zur Beurteilung der Osseointegration der Implantate durchgeführt, sondern auch verschiedene morphometrische Messungen in weiterführenden Experimenten ermöglicht werden.

#### **5.1.1 Evaluierung der Software von 2011**

Innerhalb dieses Programms erfolgte nach dem Laden einer Bild-Datei die manuelle Markierung anhand der sichtbaren Strukturen von z.B. Knochen und Implantatrand. Dabei wurden während eines Messvorgangs per Mausklick einzelne Linien nach dem folgenden standardisierten Ablauf in das Bild eingezeichnet: zwei Linien für den Anfang und das Ende der Messstrecke, einer Linie als senkrechte Referenz für die Abstände zwischen dem Knochen und Implantat sowie danach der Linien für die Kanten dieser beiden Strukturen. Anschließend berechnete die Software die Abstände zwischen den Kanten des Knochens und Implantats in Mikrometern.

Das Programm wurde im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich der Ergonomie, Flexibilität und technischen Möglichkeiten bzw. Tools evaluiert. Dabei stellten sich folgende gravierende Einschränkungen dar, die innerhalb dieser Promotionsarbeit behoben wurden:

##### **1.: keine Eingabe von Skalierungsfaktoren möglich**

Mit der Software können nur Abbildungen der Hartgewebepreparate in einer vorher definierten Auflösung ausgewertet werden.

##### **2.: kein einheitlicher Messablauf für die rechte und linke Seite in den 2D-Abbildungen**

Dieser Nachteil stellt eine potentielle Fehlerquelle während eines Messvorgangs dar.

### **3.: keine Korrektur von eingezeichneten Linien**

Beim Einzeichnen von falsch gesetzten Linien musste die jeweilige Messung abgebrochen und wiederholt werden, was zu erheblichen Zeitaufwänden führte.

### **4.: eingeschränkte Erhebung von Parametern und eingeschränkte statistische Auswertung**

Nach dem Abschluss einer Messung wurde eine Tabelle mit den Messwerten erzeugt, die im Anhang unter 9.6.1 aufgeführt ist. Diese listet die Abstände zwischen Knochen und Implantat in einem Raster von 200 Messpunkten entlang der Messstrecke auf. Das Design dieser Tabelle war festgelegt und die Möglichkeiten zur flexiblen statistischen Auswertung eingeschränkt.

### **5.: lange Auswertungszeit der erhobenen Daten**

Insgesamt resultierte für einen Messvorgang und die manuelle Nachbearbeitungszeit einer Tabelle eine Bearbeitungszeit von ca. 7 Minuten pro Abbildung.

### **6.: direkter Knochen-Implantat-Kontakt ungenau einzuzeichnen**

Bei einem direkten Kontakt zwischen Knochen und Implantat war es schwierig und zeitaufwändig, diese Bereiche präzise einzuzeichnen, da die beiden Linien für diese Strukturen exakt aufeinander liegen mussten. Dies führte zum Teil zu ungenauen Messergebnissen.

### **7.: für die Nutzung der Software wird eine Matlab-Lizenz benötigt**

Dies stellt einen Kostenfaktor dar und limitiert die Anwendung durch mehrere Nutzer an verschiedenen Computern.

Insgesamt war die Arbeit mit der zur Verfügung stehenden Histomorphometrie-Software von 2011 in den Eigenschaften der Datenerhebung, Durchführbarkeit einer Messung und der Auswertung ineffizient und fehleranfällig.

## **5.1.2 Konzeption der neuentwickelten Morphometrie-Software „Histo-Gap“**

Aufgrund der in 5.1.1 festgestellten Limitierungen wurde ein detailliertes Konzept für eine neue Morphometrie-Software erstellt und zusammen mit Christoph Greiner-Petter von der TU Ilmenau umgesetzt (Greiner-Petter 2012). Bei der Ausarbeitung des Konzepts wurden Forderungen an den Dateninput, den Datenoutput und die graphische Benutzeroberfläche (GBO) der Software aufgestellt sowie Lösungswege aufgezeigt. Eine wesentliche Anforderung an das neue Programm war die Verwendbarkeit als morphometrisches Werkzeug mit breitem Anwendungsspektrum, um diese auch im Rahmen anderer

Experimente für z.B. Messung von Schichtdicken, Abständen zwischen zahlreichen Strukturen zu nutzen. Weiterhin war es von Bedeutung, dass die Software flexibel auf Computern mit den Betriebssystemen Windows XP und 7 genutzt werden konnte.

#### **5.1.2.1 Definition und Umsetzung des Dateninputs der Software**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für den Dateninput ein detailliertes Konzept erstellt und in die Software „Histo-Gap“ nach dem folgenden Schema implementiert:

##### **1.: Einlesen der Abbildung eines histologischen Präparats**

Dabei werden automatisch Randbedingungen zur Identifizierung des Bildes eingelesen, um die lückenlose Zuordnung zu dem Versuchstier und eine automatische statistische Auswertung zu ermöglichen. Diese Randbedingungen sind in Tabelle 3 aufgelistet.

##### **2.: manuelle Eingabe von weiteren Randbedingungen entsprechen des histologischen Bildes**

Neben den automatisch eingelesenen Informationen müssen je nach Abbildung weitere Randbedingungen modifiziert werden, welche in Tabelle 3 aufgeführt sind. Diese variieren entsprechend der Fragestellungen und werden für nachfolgende Messvorgänge gespeichert.

##### **3.: Berücksichtigung eines Skalierungsfaktors**

Dieser Faktor kann wahlweise manuell bzw. anhand einer bekannten Dimension einer zu markierenden Bildstruktur durch die Software berechnet werden.

Tabelle 3: automatisch und manuell eingelesene Randbedingungen

<i>manuell eingegebene Randbedingungen</i>	<i>automatisch erkannte Randbedingungen</i>
Seite	Datum
Projektnummer	Softwareversion
Tiernummer	Benutzer
Position im Tier	Bildname
Implantatmaterial	Bildverzeichnis
Schnittnummer	Skalierungsfaktor
Verweildauer	
Methode (2D/3D)	
Färbung	

### **5.1.2.2 Definition und Umsetzung des Datenoutputs der Software**

Innerhalb dieser Promotion wurde das nachfolgende Konzept für die Codierung und Struktur der Daten erarbeitet und als Arbeitsanweisung in die Morphometrie-Software implementiert. Die Zielstellung war hierbei eine umfassende und flexible Auswertung mit der Software IBM SPSS Statistics® Version 21 zu ermöglichen.

#### **1.: automatische Generierung zweier Tabellen im csv-Format**

Es wurde je eine Tabelle mit den Daten zu den Randbedingungen der Messung und Messergebnissen im csv-Format (comma separated values) erstellt. Dieses Format ermöglichte eine umfangreiche Auswertung mit dem Statistikprogramm SPSS Statistics®.

#### **2.: Generierung einer fortlaufenden ID für jeden Messvorgang**

Die ID (Identifikator) diente zur Zuordnung der Daten einer einzelnen Messung und wurde in jeder Tabellenzeile des Ausgabeformats gespeichert. Weiterhin ermöglichte diese Nummer die Verknüpfung der Tabellen mit den Messergebnissen mit den Tabellen der Randbedingungen und dadurch eine automatische sowie flexible statistische Auswertung.

### **5.1.2.3 Die graphische Benutzeroberfläche der Software**

Anhand der Anforderungen, die für den Dateninput und -output sowie für den Ablauf eines Messvorgangs definiert worden sind, erfolgte die Konzipierung und Realisierung der graphischen Benutzeroberfläche nach dem folgenden Schema:

#### **1.: einheitlicher Ablauf eines Messvorgangs für die rechte und linke Seite**

Hierbei wurde in Grundzügen der Ablauf eines Messvorgangs aus der Software von 2011 übernommen: das Einzeichnen der beiden Linien als Anfang und Ende der Messstrecke, einer Linie als senkrechte Referenz für die Abstände zwischen den Strukturen und danach der Linien für die entsprechenden Elemente. Dabei war dieser Vorgang zwischen der rechten und linken Seite in den 2D-Abbildungen gleich.

#### **2.: Messung mehrerer Abstände zwischen Strukturen**

Durch diesen Aspekt werden verschiedene Parameter gleichzeitig erhoben und der Anwendungsbereich der Software erweitert.

#### **3.: Korrektur einer eingezeichneten Linie**

Die Eingabe einer zuletzt eingezeichneten Linie kann korrigiert werden, um untersucherabhängige Eingabefehler zu berichtigen und Zeit zu sparen.

#### 4.: Entwicklung einer Routine für den Messvorgang

Der Ablauf eines Messvorgangs wurde standardisiert, in dem die einzelnen Abschnitte, wie z.B. das Einzeichnen der Linien und die Eingabe der Rahmenbedingungen durch nacheinander zu öffnende Benutzerfenster getrennt wurden. Die verschiedenen Benutzerfenster sind in Anhang unter 9.3.1 dargestellt.

#### 5.: Einzeichnen von Linien bei einem Knochen-Implantat-Abstand von 0 $\mu\text{m}$

Für diesen Fall wurde ein Algorithmus in die Software integriert, der das Markieren des Knochen- und Implantatrandes erleichtern sollte. Bei einem Knochen-Implantat-Abstand von 0  $\mu\text{m}$  (direkter BIC) müssten diese beiden Linien exakt aufeinander liegen, damit die Software von 2011 dies als direkten Kontakt erkennt. Bei dem neuen Algorithmus wurde die Linie einer Struktur (z.B. Knochen, Implantat) so eingezeichnet, dass sich die Linien am Anfang und Ende der Messstrecke überschneiden und so ein „negativer Abstand“ zu Stande kam. Dieser wurde daher von der Software „Histo-Gap“ als Abstand von 0  $\mu\text{m}$  zwischen den beiden Linien interpretiert. Im Falle eines Abstandes  $> 0 \mu\text{m}$  befand sich ein positiver Abstand zwischen den beiden Linien, da keinerlei Überschneidung stattfand. Das Prinzip ist in Abbildung 19 dargestellt.

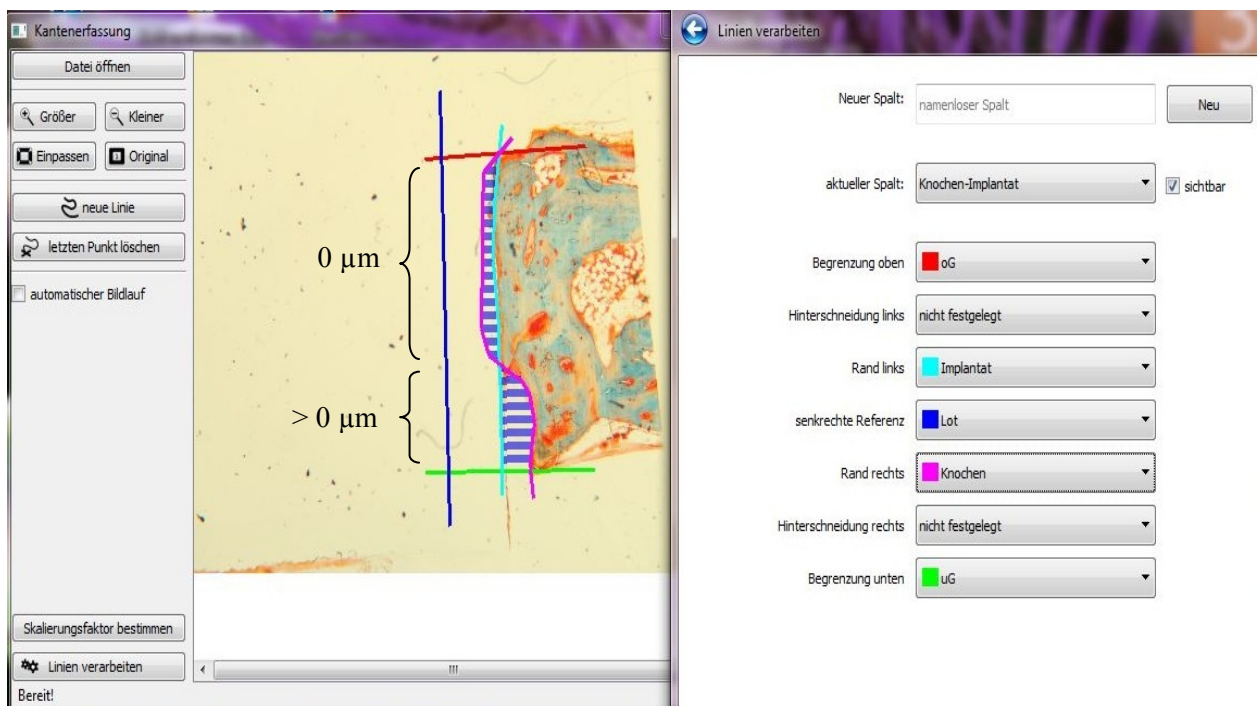


Abbildung 19: Algorithmus bei einem direkten Knochen-Implantat-Kontakt in der Software „Histo-Gap“



### 5.1.3 Testphase mit Evaluierung der Betaversionen

Nach Erstellung des Konzepts wurde dieses durch Christoph Greiner-Petter von der TU Ilmenau schrittweise in die Software integriert. Dieser Entwicklungsprozess vollzog sich über ca. 9 Monate und führte zur Erstellung von fünf Betaversionen. Das Ziel war hierbei, eine umfassende und flexible Auswertung mit der Software IBM SPSS Statistics® Version 21 zu ermöglichen. Während dieser Zeit erfolgte die kontinuierliche Evaluierung der verschiedenen Versionen und Implementierung weiterer Ergänzungen in die Morphometrie-Software „Histo-Gap“. Eine Zusammenfassung der wesentlichen Merkmale der einzelnen Betaversionen ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Zusammenfassung der wesentlichen Kennzeichen der Betaversionen

<b>Betaversion</b>	<b>Prüfung</b>
1.Betaversion	- Evaluierung der Funktionsfähigkeit auf den Betriebssystemen Windows XP und 7
2.Betaversion	- Design der graphischen Benutzeroberfläche - Buttons mit den verschiedenen Funktionen enthalten, nicht funktionsfähig
3.Betaversion	- Evaluierung der Generierung einer Auswertungstabelle nach einem Messvorgang - Ausgabetabelle enthält Zeilen mit dem Bildnamen, Datum, Nutzer, Skalierungsfaktor (kann noch nicht eingegeben werden)
4.Betaversion	- Löschen der letzten Eingabe einer Linie - Eingabe und Berechnung eines Skalierungsfaktors - Benennung der eingezeichneten Linien - Datenanpassung an die jeweilige Messung - Auswertungstabelle im csv-Format erstellt, mit dem Bildnamen beschriftet
5.Betaversion	- je eine Tabelle mit den Rahmenbedingungen und Messergebnissen automatisch nach einem Messvorgang generiert, mit Bildnamen beschriftet - ergonomische Auswertung mit SPSS Statistics® noch nicht möglich
Endgültige Version	- Evaluierung beendet - ausgegebene Tabellen mit einer ID gekennzeichnet - Beurteilung der Histologien und 3D-Datensätze - flexible und ergonomische Auswertung mit SPSS Statistics® möglich

Die Fertigstellung der ersten Betaversion erfolgte nach ca. zwei Wochen. Hierbei wurde gezeigt, dass die Software auf allen vorhandenen Computern mit dem Betriebssystem Windows XP und 7 funktionsfähig war. Ca. vier Monate später erfolgte die Evaluierung der zweiten Betaversion. Anhand dieser Version wurde das grundlegende Design der graphischen Benutzeroberfläche bewertet, welche Abbildung 20 dargestellt. Dabei zeigte sich, dass die

GBO bereits Buttons für die verschiedenen Optionen wie z.B. für das Einzeichnen von Linien oder Öffnen eines Bildes enthielt, wobei die Buttons noch nicht funktionsfähig waren.

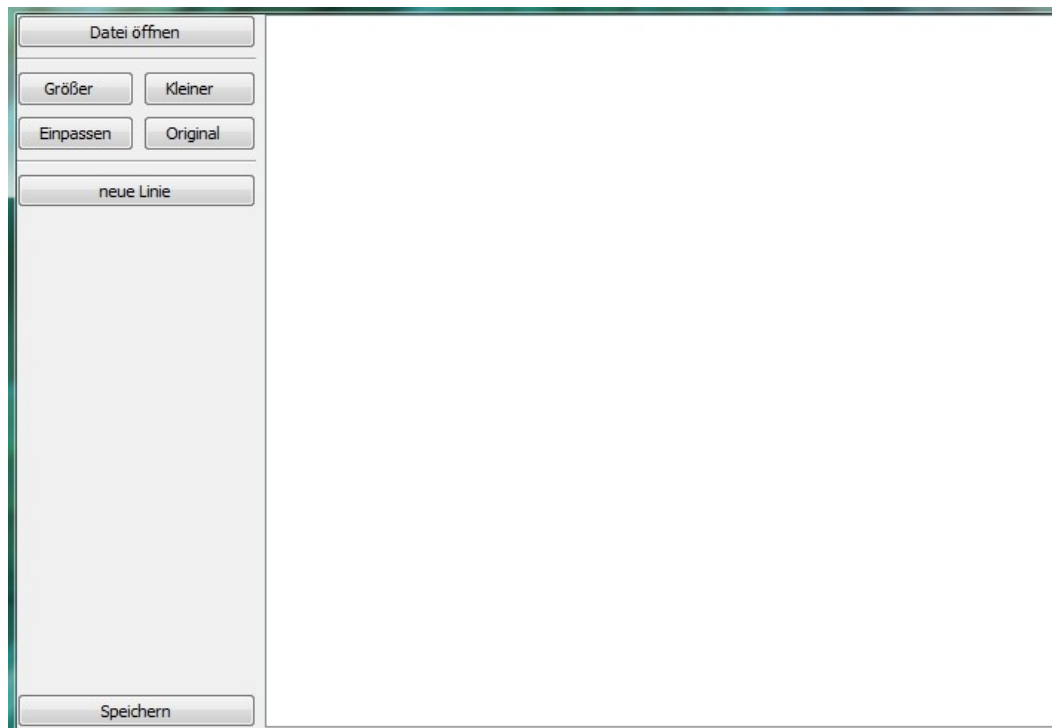


Abbildung 20: Graphischen Benutzeroberfläche der zweiten Betaversion

Nach einer weiteren Entwicklungszeit von einem Monat wurde die fehlerfreie Generierung der Auswertungstabelle (Datenoutput) überprüft. Hierbei enthielt die erstellte Tabelle, welche in Abbildung 21 dargestellt ist, bereits den Dateinamen, die Bildquelle, das Datum der Messung, den Benutzernamen, Zeilen mit verschiedenen Merkmalen sowie den Skalierungsfaktor. Aufgrund der Formatierung war eine ergonomische Auswertung mit der Software IBM SPSS Statistics<sup>®</sup> nicht möglich.

	A	B
1	Dateiname	T 22.1.3 HE
2	Merkmal 1	
3	Merkmal 2	
4	Merkmal 3	
5	Merkmal 4	
6	Datum	21.02.2012
7	Bearbeiter	Acer
8	Skalierungsfaktor	x

Abbildung 21: Auswertungstabelle der dritten Betaversion

Im Rahmen der Evaluierung der vierten Betaversion wurden weitere Festlegungen für die Eingabe und Ausgabe der Daten definiert. Bei der Prüfung fiel auf, dass bei diesem Entwicklungsstand der Software ein standardisierter Messvorgang mit Beschriftung und Kennzeichnung der Linien, das Löschen der letzten Eingabe eines Messpunktes, das Einsetzen und Berechnen eines Skalierungsfaktors sowie eine flexiblere Datenanpassung gewährleistet waren. Die nach einem Messvorgang generierte Auswertungstabelle war nun durch den Bildnamen benannt und eine ergonomische statistische Auswertung aufgrund der Formatierung weiterhin nicht möglich. Diese Version der neuen Morphometrie-Software entsprach in höherem Maße den gestellten Anforderungen. Nach weiteren drei Monaten stand eine fünfte Betaversion für die Evaluierung zur Verfügung. Diese entsprach in ihrer Funktions- und Arbeitsweise im Wesentlichen der endgültigen Version der Software. Bei der Testung stellte sich heraus, dass nach einem Messvorgang jeweils eine Tabelle mit dem Rahmenbedingungen (Dateninput) und dem Messergebnissen generiert wurden, die weiterhin durch den Bildnamen gekennzeichnet waren. Bei diesen beiden Tabellen war die Formatierung dieser Auswertetabellen noch nicht kompatibel mit SPSS Statistics® und Mängel bei der Datenanpassung vorhanden.

Zwei Monate später wurde die endgültige Version fertig gestellt, geprüft und zur Beurteilung der Osseointegration der Hartgewebhistologien freigegeben. In diese Endversion der Morphometrie-Software wurde insbesondere implementiert, dass die Daten der bei jedem Messvorgang automatisch generierten Auswertungstabellen durch eine fortlaufende, eindeutige ID gekennzeichnet sind.

#### **5.1.4 Ergebnis der Entwicklungsarbeit**

Während einer Entwicklungszeit von 9 Monaten wurde das Programm „Histo-Gap“ anhand des erarbeiteten Konzepts fertiggestellt. Damit stand nun ein Werkzeug für morphometrische Messungen zur Verfügung, bei welchem das Design der graphischen Benutzeroberfläche, die Arbeitsweise, die verarbeiteten Daten und das Ausgabeformat der Daten im Vergleich zur Software von 2011 verändert wurden. Aufgrund der gestellten Anforderungen und Erneuerungen innerhalb der Software wurde ein breites Anwendungsspektrum für morphometrische Messungen gewährleistet. Die graphische Benutzeroberfläche des neuen Programms ist in Abbildung 22 dargestellt. Eine ausführliche Übersicht zur Funktionsweise der Software und allen Tools ist im Anhang unter 9.5.1 aufgeführt. Die benötigte Zeitdauer für einen Messvorgang wurde von ca. sieben auf ca. drei Minuten reduziert.

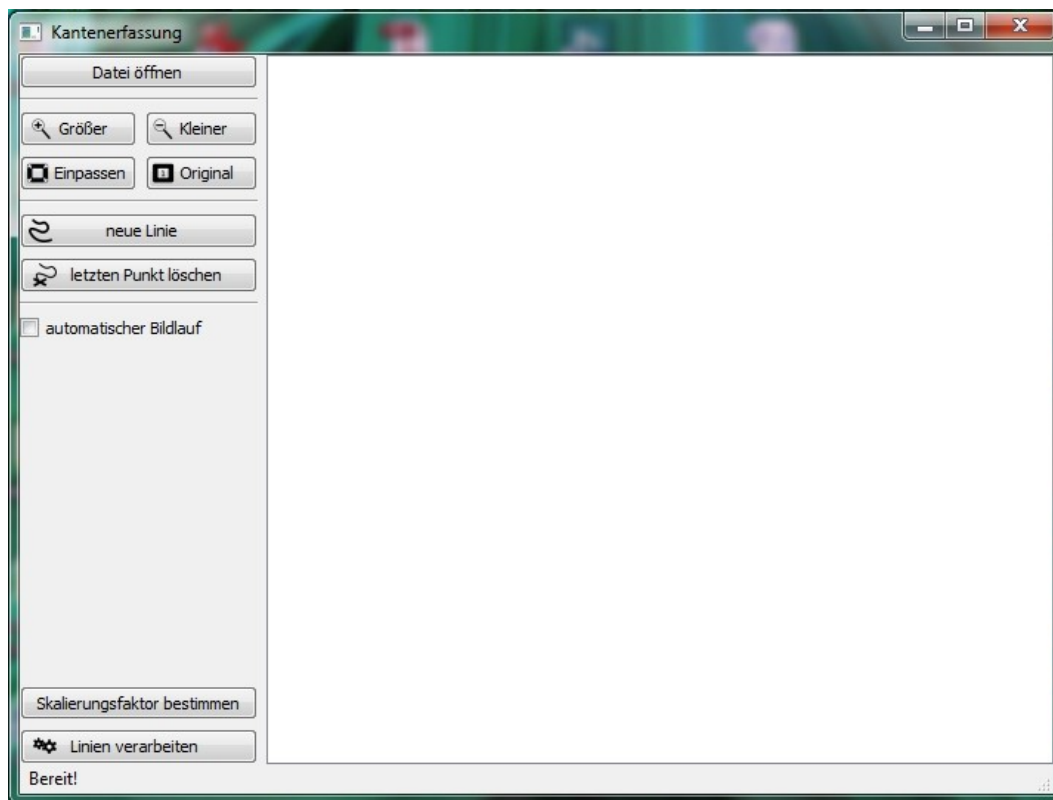


Abbildung 22: Benutzeroberfläche der Software „Histo-Gap“

Ein Auszug aus den beiden Auswertungstabellen mit den Messergebnissen und Randbedingungen ist in Abbildung 23 und 24 dargestellt.

	A	B	C	D	E	F
1	Mess-ID	Tiefe_relativ	Tiefe_absolut	Abstand Spalt 1 in $\mu\text{m}$	Abstand Spalt n	
2	106	0	0	166.622		
3	106	1	227.372	136.421		
4	106	2	454.744	102.921		
5	106	3	682.116	770.777		
6	106	4	909.489	608.393		
7	106	5	113.686	593.289		
8	106	6	136.423	626.708		
9	106	7	159.16	634.002		
10	106	8	181.898	598.363		
11	106	9	204.635	580.346		
12	106	10	227.372	580.187		

Abbildung 23: Auszug aus der Tabelle mit den Messwerten

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	ID	Skalierungsfaktor	Seite	Tiernummer	Implantatmaterial	Schnittnummer	Verweildauer	Methode	Färbung
2	106	11.494	rechts	17	Polymer-Kontrolle	4	3	2D	HE

Abbildung 24: Auszug aus der Tabelle mit den Rahmenbedingungen einer Messung

### 5.1.5 Zusammenfassung und Vergleich der evaluierten Softwares

Das Resultat der Entwicklung und Programmierung war das neue Programm „Histo-Gap“, welches im Vergleich zu der Software von 2011 eine ergonomische und effiziente Datenerhebung und –anpassung ermöglicht. Weiterhin besitzt diese neue Software ein breites Anwendungsspektrum und eine Erweiterbarkeit in ihrer Funktionalität. Eine Zusammenfassung der wichtigsten Eigenschaften der beiden Versionen ist in Tabelle 5 vergleichend dargestellt.

Tabelle 5: Vergleich der beiden Software-Anwendungen

	<b><u>Software von 2011</u></b>	<b><u>„Histo-Gap“</u></b>
Parameter	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Knochen-Implantat-Abstand</li> <li>- Knochen-Implantat-Kontakt (BIC)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Knochen-Implantat-Abstand</li> <li>- Knochen-Implantat-Kontakt (BIC)</li> <li>- frei wählbare Parameter</li> </ul>
Ablauf eines Messvorgangs	<ul style="list-style-type: none"> <li>- standardisierter Ablauf</li> <li>- seitenabhängig</li> <li>- keine Korrektur eingezeichneter Linien</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- standardisierter Ablauf durch verschiedene Fenster unterteilt</li> <li>- seitenunabhängig</li> <li>- Korrektur eingezeichneter Linien</li> <li>- eingegebene Informationen speicherbar</li> </ul>
Eingabe eines Skalierungsfaktors	- nicht möglich, Auflösung wurde vorher durch Programmierer festgelegt	- möglich, Auswertung von Bildern verschiedener Auflösungen
Auswertungstabellen	<ul style="list-style-type: none"> <li>- eine Tabelle mit den Messergebnissen</li> <li>- Excel-Format</li> <li>- nicht modifizierbar</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Trennung von Messergebnissen und Randbedingungen</li> <li>- csv-Format</li> <li>- durch weitere Parameter modifizierbar</li> </ul>
Statistische Analyse	- hoher Nachbearbeitungsaufwand der Tabelle	<ul style="list-style-type: none"> <li>- weniger Nachbearbeitung</li> <li>- Verknüpfung der Tabellen durch ID</li> </ul>
Arbeitsaufwand	- hoch	- geringer, ergonomisch
Programmierung	- Matlab-Lizenz benötigt	- funktionsfähig auf Windows XP und Windows 7
Zeitdauer für einen Messvorgang	- 7 Minuten	- 3 Minuten

## 5.2 Osseointegration der Hartgewebekonstruktionen mit der Polymerkomponente UM oder UD

### 5.2.1 Verteilung der Daten und Regressionsanalyse

Bei der Darstellung der **Datenverteilung** mit Hilfe eines Boxplots zeigte sich eine relativ hohe Streuung der Ergebnisse des BICs (bone-implant-contact) bezogen auf die TCP-Polymer-Composit-Implantate mit den Verweildauern von 3, 6 und 9 Monaten. Diesen Fakt stellt der Boxplot in Abbildung 25 dar.

Jeweils 3 und 6 Monate nach Implantation war die Streuung der Daten bei den Implantaten mit der Polymerkomponente Dimethacrylat (Copolymer aus UDMA und UD) deutlich größer als bei dem Monomethacrylat (Copolymer aus UDMA und UM). Der Median des BICs war bei den Implantaten aus UM nach 3 Monaten Verweildauer (100 %) höher als bei denen mit UD (40 %) und nach 6 Monaten in beiden Polymer-Gruppen gleich (100 %). 9 Monate nach Implantation wiesen die Probekörper mit UM eine größere Streuung der Ergebnisse des BICs auf als die Implantate mit UD-Komponente. Der Median des BICs war nach diesem Zeitraum nun bei UD (80 %) höher als bei UM (35 %).

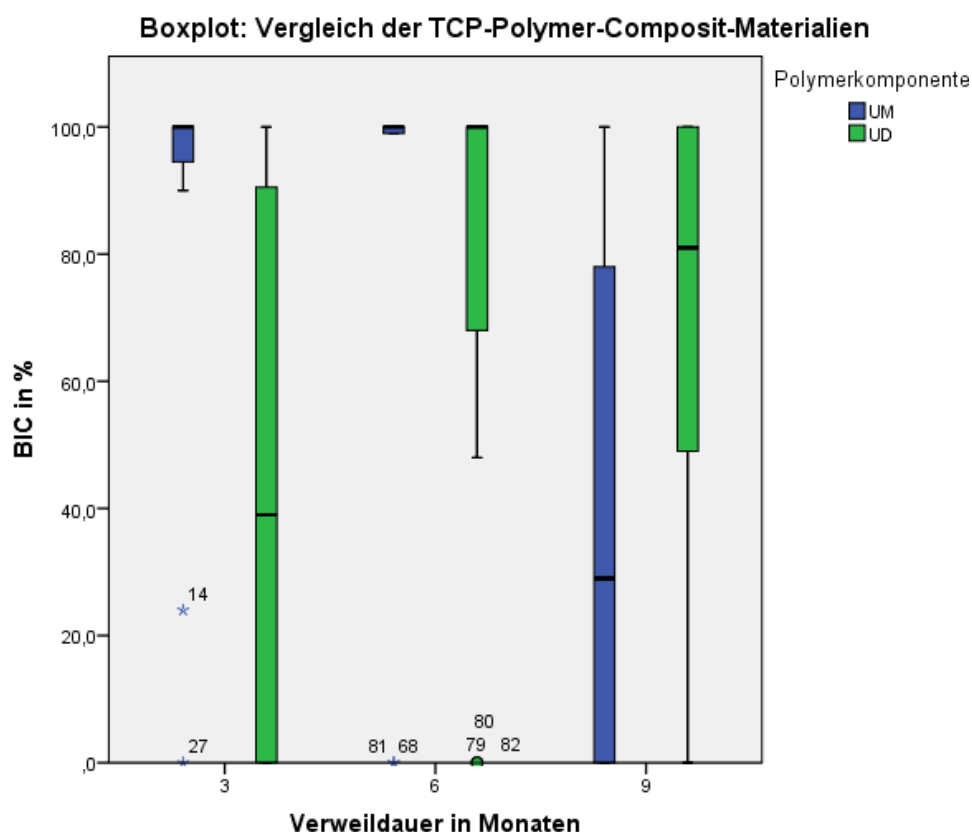


Abbildung 25: Boxplot mit Darstellung der Streuung der Daten nach 3, 6 und 9 Monaten

Bei Betrachtung der Regression zwischen dem BIC und der äußeren bzw. inneren Position bezogen auf den Schädel zeigte sich, dass der BIC prozentual vom Schädeläußeren zum Schädelinneren um den Koeffizient -0,143 % (Standardfehler: 0,05 %) abnimmt. Der Determinationskoeffizient  $r^2$  beträgt 0,896, weshalb die Position der Messpunkte bezogen auf den Schädelknochen 89 % der Varianz des BICs erklärte und 11 % dieses Zusammenhangs durch andere Faktoren bestimmt waren. Da  $r = 0,95$  war, kann davon ausgegangen werden, dass der Zusammenhang zwischen der Position im Schädeläußeren bzw. -inneren und dem BIC stark war. Diese Tatsache wird in Abbildung 26 gezeigt.

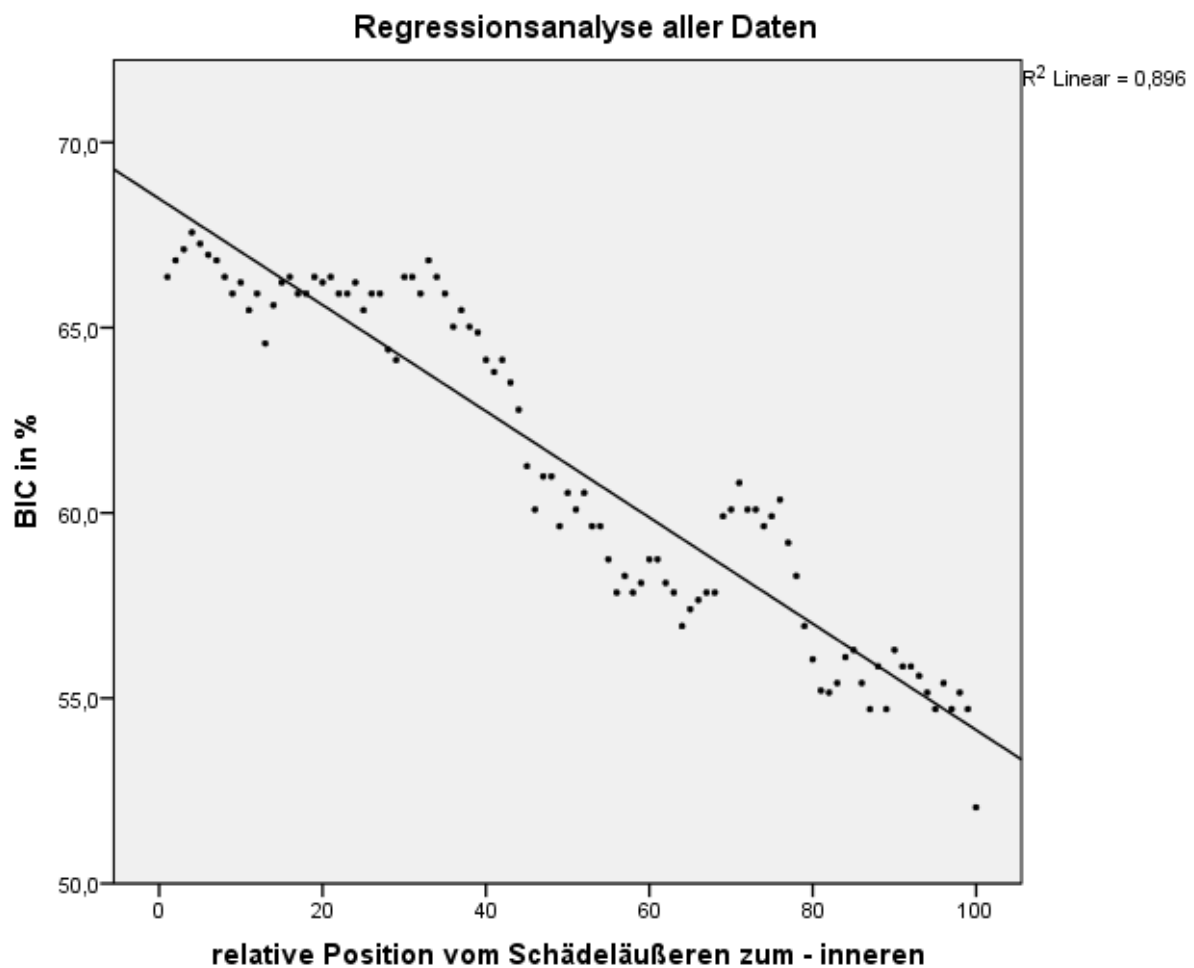


Abbildung 26: Zusammenhang zwischen dem BIC und der Position entlang des Schädelknochens von außen nach innen

## 5.2.2 BIC der Implantate mit den Polymerkomponenten UM oder UD

### 5.2.2.1 Vergleich des BICs der Polymerkomponente UM und UD bezogen auf die Verweildauern von 3, 6 und 9 Monaten

Hierbei werden für jede Gruppe die Kontrolle aus Polymer, die unbearbeiteten und nicht bearbeiteten Composit-Implantate nach den Verweildauern von 3, 6 und 9 Monaten betrachtet, um den Einfluss der Verweildauer auf den BIC zu untersuchen.

Nach Zusammenfassung der drei Implantationszeiträume zeigte sich bei der Polymerkomponente UM ein BIC von 72,58 % und bei UD von 57,13 %. Dieses Ergebnis war statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ).

Nach 3, 6 und 9 Monaten wurden die folgenden Mittelwerte des BICs für die beiden Komponenten UM und UD erhoben, welche in den Tabellen 6 und 7 dargestellt sind:

Tabelle 6: BIC der Implantate mit der Polymerkomponente UM nach 3, 6 und 9 Monaten

<b>BIC der Implantate mit der Polymerkomponente UM nach Verweildauern</b>				
Verweildauer in Monaten	Mittelwert in %	Standardfehler in %	95% Wald-Konfidenzintervall	
			Unterer Wert	Oberer Wert
3	76,000	8,3051	63,898	96,454
6	91,455	6,4519	78,809	104,100
9	46,675	9,5217	28,013	65,337

Tabelle 7: BIC der Implantate mit der Polymerkomponente UD nach 3, 6 und 9 Monaten

<b>BIC der Implantate mit der Polymerkomponente UD nach Verweildauern</b>				
Verweildauer in Monaten	Mittelwert in %	Standardfehler in %	95% Wald-Konfidenzintervall	
			Unterer Wert	Oberer Wert
3	45,875	11,4417	23,450	68,300
6	64,476	4,5146	55,627	73,324
9	62,742	8,5544	45,976	79,508



Dabei zeigte sich, dass die Implantate mit der Polymerkomponente UM nach 3 und 6 Monaten eine höheren BIC aufwiesen als die Implantate mit UD. Lediglich nach 9 Monaten Verweildauer wiesen die Probekörper mit UD einen höheren BIC auf. Weiterhin konnte man erkennen, dass die geschätzten Mittelwerte bei den Implantaten mit UD weniger starken Schwankungen unterlagen als bei denen mit UM.

Der BIC war bei den Implantaten aus UM von 3 Monaten zu 9 Monaten und 6 Monaten zu 9 Monaten statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ). Bei der Polymerkomponente UD wurde keine Signifikanz für die drei verschiedenen Verweildauern nachgewiesen ( $p > 0,05$ ).

#### 5.2.2.2 Vergleich der Polymer-Kontrolle, des bearbeiteten und unbearbeiteten Composites in den Gruppen mit UM oder UD

Dabei wurden die drei Implantate in ihren Gruppen nach 3, 6 und 9 Monaten betrachtet. Es zeigten sich die folgenden Ergebnisse in Tabelle 8 und 9:

Tabelle 8: BIC der Implantate in der Gruppe mit UM-Komponente nach 3, 6 und 9 Monaten

<b>Zusammenfassung der Implantate mit der Polymerkomponente UM nach 3, 6 und 9 Monaten</b>					
Implantatmaterial	Verweildauer in Monaten	Mittelwert in %	Standardfehler in %	95% Wald-Konfidenzintervall	
				Unterer Wert	Oberer Wert
Polymer-Kontrolle	3	67,600	9,5788	48,826	86,374
	6	99,727	0,0730	99,584	99,870
	9	59,071	15,6958	28,308	89,835
Composit bearbeitet	3	99,500	0,0000	99,500	99,500
	6	99,636	0,1301	99,381	99,891
	9	33,071	8,1217	17,153	48,990
Composit unbearbeitet	3	73,429	16,1047	41,864	104,993
	6	75,000	19,2638	37,244	112,756
	9	47,882	10,4807	27,340	68,424

Tabelle 9: BIC der Implantate in der Gruppe mit **UD**-Komponente nach 3, 6 und 9 Monaten

<b>Zusammenfassung der Implantate mit der Polymerkomponente UD nach 3, 6 und 9 Monaten</b>					
Implantatmaterial	Verweildauer in Monaten	Mittelwert in %	Standardfehler in %	95% Wald-Konfidenzintervall	
				Unterer Wert	Oberer Wert
Polymer-Kontrolle	3	45,733	6,9457	32,120	59,347
	6	39,269	5,3172	28,847	49,690
	9	49,643	7,8967	34,166	65,120
Composit bearbeitet	3	67,455	13,7104	40,583	94,326
	6	91,313	3,5169	84,420	98,205
	9	78,406	13,7657	51,426	105,387
Composit unbearbeitet	3	24,438	15,8777	6,682	55,557
	6	62,846	4,7572	53,522	72,170
	9	60,176	7,2563	45,954	74,399

#### *Polymerkomponente UM*

Bei der Gruppe mit UM wies das bearbeitete Composit nach 3 Monaten Implantation den höchsten BIC und die Polymer-Kontrolle den niedrigsten BIC auf. Dieses Ergebnis war hierbei statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ). Auch 6 Monate nach Implantation zeigte das bearbeitete Composit den höchsten BIC im Vergleich zur Kontrolle und dem unbearbeiteten Composit. Diese Tatsache änderte sich 9 Monate nach Implantation, da das bearbeitete Composit nun den geringsten BIC und die Polymer-Kontrolle den höchsten BIC aufwies.

#### *Polymerkomponente UD*

In dieser Gruppe waren die Unterschiede zwischen den Implantaten geringer als bei UM. 3 Monate nach Implantation wies auch hier das bearbeitete Composit den höchsten BIC und das unbearbeitete Composit deutlich den niedrigsten BIC auf. Nach der Verweildauer von 3 Monaten war der BIC der Polymerkontrolle statistisch signifikant zum BIC des bearbeiteten Composites und unbearbeiteten Composites ( $p < 0,05$ ). Des Weiteren zeigte sich eine statistische Signifikanz zwischen dem Ergebnis der unbearbeiteten und bearbeiteten Composit-Implantate ( $p < 0,05$ ).

Ebenfalls 6 Monate nach Implantation nahm der BIC bei dem bearbeiteten und unbearbeiteten Composit zu. Hierbei war der BIC der Polymer-Kontrolle statistisch signifikant zum BIC des

bearbeiten und unbearbeiteten Composit-Implantats sowie das Ergebnis des unbearbeiteten zum bearbeiteten Composit-Probekörpers ( $p < 0,05$ ).

Nach 9 Monaten Verweildauer wies das bearbeitete Composit wiederum den höchsten BIC im Vergleich zu den anderen beiden Materialien auf. Dabei waren der BIC der Polymerkontrolle statistisch signifikant zum BIC des bearbeiteten und unbearbeiteten Composit-Implantats ( $p < 0,05$ ).

### **5.3 Auswertung der Kontroll-Implantate aus TCP**

Von insgesamt 52 Schnitten mit Tricalciumphosphat(TCP)-Implantaten wurden 43 Präparate in die Auswertung einbezogen, wobei von jedem Tier und Implantatzeitraum mindestens 2 Schnitte ausgewertet wurden. Die restlichen Proben konnten aufgrund mangelnder Qualität nicht für die Beurteilung verwendet werden. Es erfolgte die Untersuchung, wie viel TCP nach jeweils 3, 6 und 9 Monaten durch Knochen ersetzt wurde und in welcher Form der Knochenaufbau stattfand.

Drei Monate nach Implantation zeigten gemessen mit modifizierten Score nach Brandt et al. jeweils 26,7 % der TCP-Implantate eine Resorption vom Grad 1 bzw. Grad 3 und 40 % der Präparate eine Resorption vom Grad 2. In nur 6,7 % der Schnitte wiesen die TCP-Implantate eine Resorption vom Grad 4 auf. Der Ersatz durch Knochen fand als deutliche Neubildung statt (Score = 2). Abbildung 27 und 28 zeigen eine Resorption von Grad 1 und 2 im Vergleich. Dabei ist das TCP-Präparat mit einer schwarzen Linie umrandet und der Knochen stellt sich in der modifizierten Masson-Goldner-Färbung blau bzw. in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung rot dar.

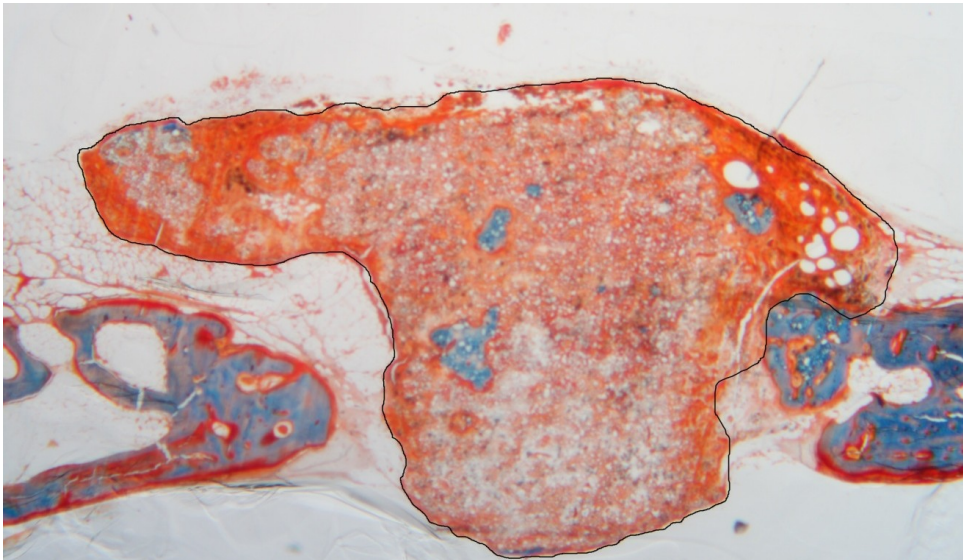


Abbildung 27: Resorption Grad 1, schwarz umrandetes TCP-Präparat, modifizierte MG-Färbung, 20fache Vergrößerung

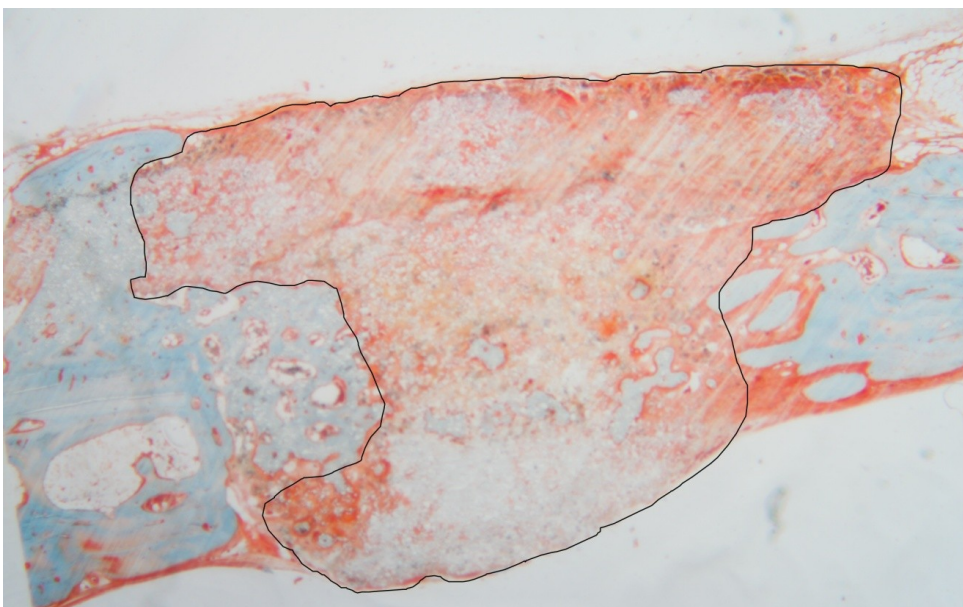


Abbildung 28: Resorption Grad 2, schwarz umrandetes TCP-Präparat, modifizierte MG-Färbung, 20fache Vergrößerung

Nach einer Verweildauer von sechs Monaten wurden 17,6 % der Implantate im Grad 2 resorbiert. 29,4 % der Schnitte wiesen eine Grad 3- und 52,9 % eine Grad 4- Resorption auf. Wiederum wurde das Material nach der Resorption in allen Schnitten durch massiven Knochen (Score = 2) ersetzt. In Abbildung 29 ist ein Beispiel für eine Resorption nach Grad 3 aufgeführt.

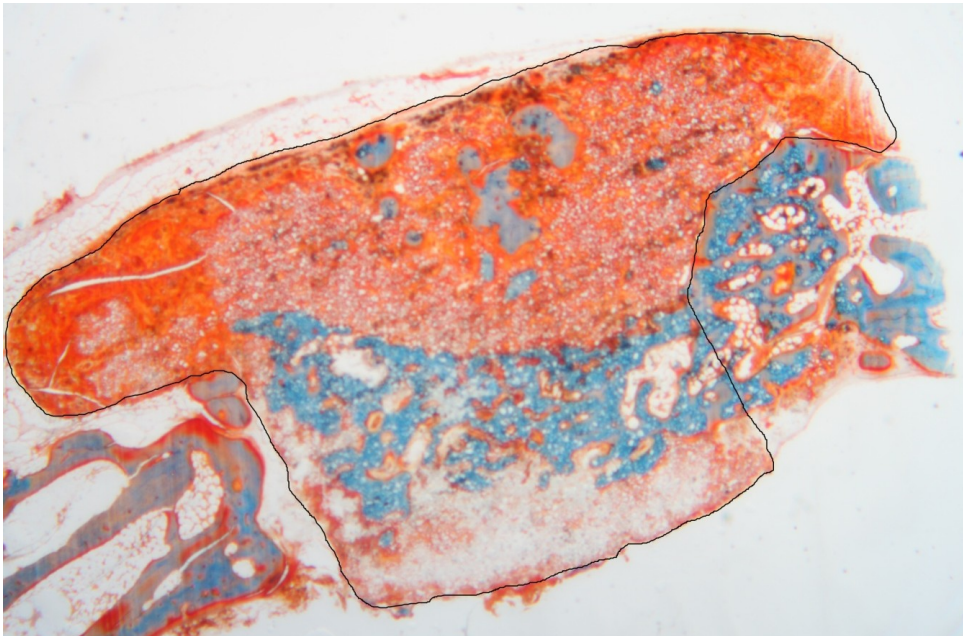


Abbildung 29: Resorption Grad 3, schwarz umrandetes TCP-Präparat, modifizierte MG-Färbung, 20fache Vergrößerung

Neun Monate nach Implantation zeigten 18,2 % eine Resorption nach Grad 3 und 81,8 % der Probekörper nach Grad 4, wobei das TCP-Präparat durch deutlichen neugebildeten Knochen ersetzt wurde (Score = 2). Abbildung 30 zeigt ein Beispiel für eine Resorption nach Grad 4.

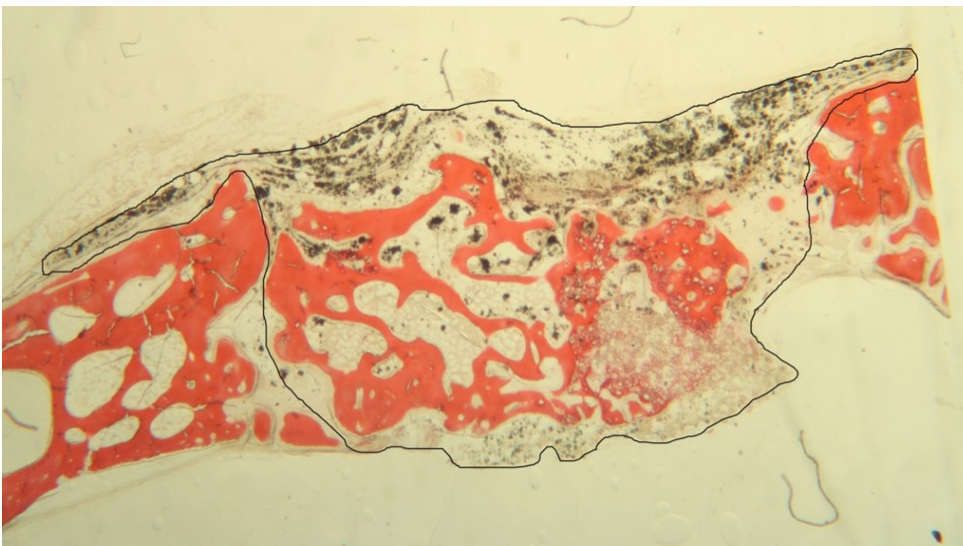


Abbildung 30: Resorption Grad 4, schwarz umrandetes TCP-Präparat, HE-Färbung, 20fache Vergrößerung

### 5.3.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse wird im Diagramm in Abbildung 31 gezeigt. Es stellt den Anteil der histologischen Schnitte und deren Verteilung auf die verschiedenen Resorptionsgrade nach den Verweildauern von 3, 6 und 9 Monaten dar.

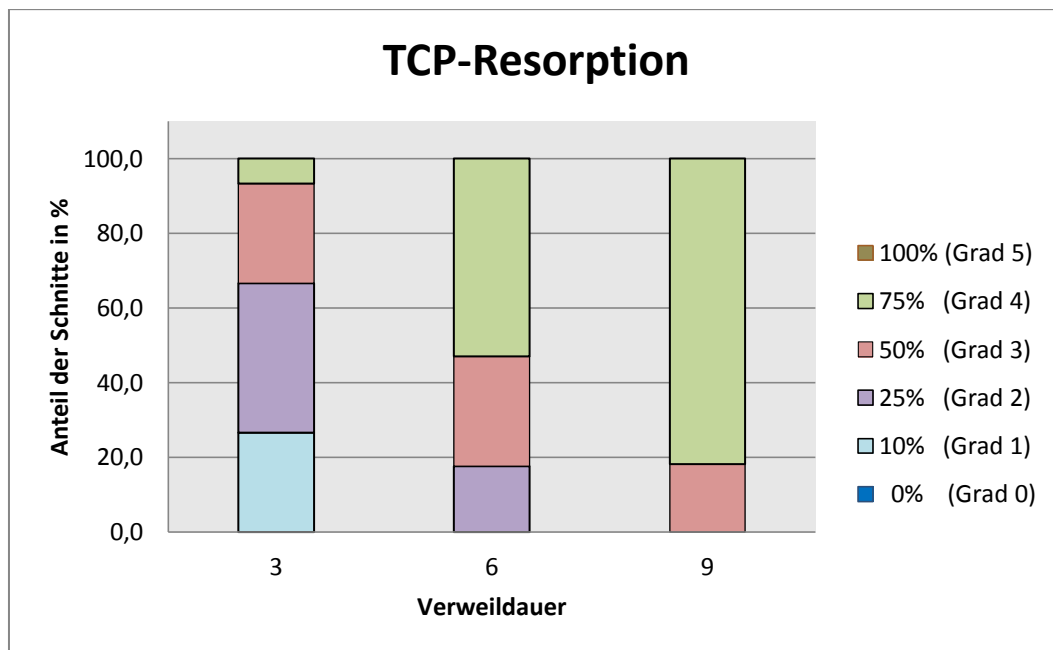


Abbildung 31: TCP-Resorption 3, 6 und 9 Monaten nach Implantation, Gradeinteilung nach modifizierten Score nach Brandt et al. 2010

Über die Zeiträume von 3, 6 und 9 Monaten wurden alle TCP-Implantate in unterschiedlichem Maße durch Knochen ersetzt. Kein Probekörper wurde nach den betrachteten Verweildauern gar nicht bzw. vollständig resorbiert. Während der analysierten Zeitspanne nahm die Resorption der Implantate stetig zu, sodass mit 9 Monaten der Großteil der Probekörper resorbiert und überwiegend durch Knochen ersetzt wurde. Dabei erfolgte in allen Fällen ein deutlicher Knochenaufbau.

## **5.4 Untersuchung der Osseointegration in den 3D-Datensätzen der Implantate**

Um in Ergänzung zu den 2D-Hartgewebephistologien weitere Informationen zur Osseointegration der Implantate zu gewinnen, wurden zwölf im  $\mu$ CT erstellte 3D-Datensätze der Implantate in die Auswertung einbezogen. Die  $\mu$ CT-Scans wurden in Serie unter identischen Aufnahmebedingungen hergestellt und haben deshalb ähnliche Werte in ihrer Helligkeit bzw. Kontrast zwischen den Voxeln. Das Ziel war eine möglichst ergonomische, semiautomatische Segmentierung der TCP-Polymer-Composit-Implantate vom Knochen mit Hilfe der zur Verfügung stehenden Module der Software Avizo® Fire 6.3. Aufgrund der Größe und Komplexität der 3D-Datensätze der Implantate wäre eine manuelle Segmentierung sehr arbeits- und zeitaufwendig. Die Evaluierung einer Methode zur semiautomatischen bzw. automatischen Segmentierung dieser 3D-Datensätze war bisher nicht erfolgt. Daher wurden verschiedene Segmentierungsprinzipien innerhalb der Promotionsarbeit getestet, um einen geeigneten und praktisch anwendbaren Algorithmus zu finden.

### **5.4.1 Testung der Segmentierungsprinzipien**

Aufgrund der ähnlichen Eigenschaften hinsichtlich der Helligkeiten und Kontraste wurden für die Evaluierung der Segmentierungsprinzipien Beispieldatensätze verwendet und anhand der folgenden Prinzipien untersucht: manuelle Festlegung eines Schwellenwertes, Auffinden eines geeigneten Schwellenwertes mit Hilfe eines Histogramms, das Erkennen von Kontrasten an Kanten (Watershed-Segmentierung) und das Region Growing. Die Schwierigkeit einer semiautomatischen Segmentierung bestand bei den vorliegenden 3D-Datensätzen der Implantate in der Abgrenzbarkeit der Probekörper vom Knochen, da diese calciumphosphathaltigen Strukturen aufgrund ihrer Röntgendichte vergleichbare Grauwerte bzw. Helligkeiten aufwiesen. Dies ist anhand eines Schnittes des 3D-Datensatzes (Ortho-Slice) in Abbildung 32 verdeutlicht. Dieser stellt die calciumphosphathaltigen (Knochen, TCP-Polymer-Composit-Implantat, grau) und calciumphosphatfreien Strukturen (Luft, Einbettungsmedium, Bindegewebe, dunkel) dar.



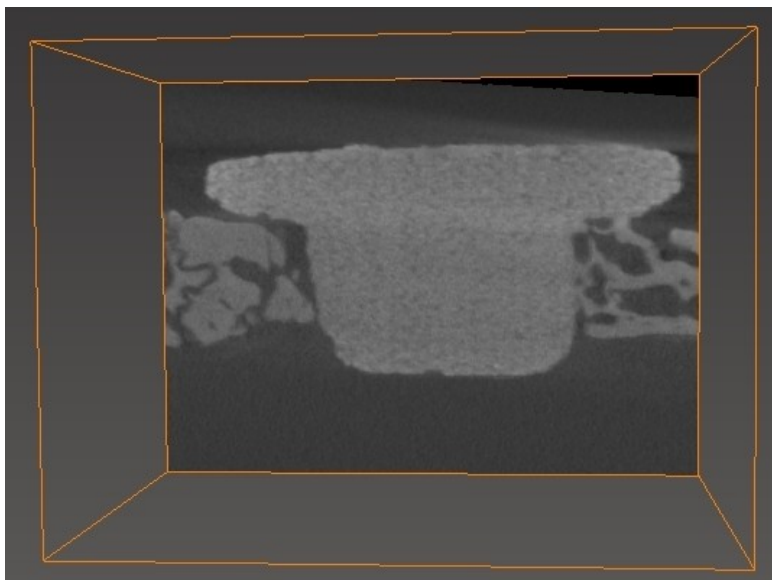


Abbildung 32: „Ortho Slice“ eines TCP-Polymer-Composit-Implantats, Avizo® Fire 6.3

Eine ausführlichere Auflistung der praktischen Testung der Arbeitsschritte 5.3.1.1 bis 5.3.1.3 ist im Anhang unter 9.5.2 zu finden.

#### **5.4.1.1 Evaluierung des Segmentierungsprinzips mit Hilfe eines Schwellenwerts**

Zunächst wurde vor der Prüfung dieses Segmentierungsprinzips ein Gauß-Filter angewendet, um Inhomogenitäten zwischen benachbarten Pixeln des 3D-Datensatzes auszugleichen und die Segmentierung nach einem Schwellenwert der Röntgendichten zu erleichtern. Dabei zeigte sich eine geringfügige Glättung der Flächen von Kochen und Implantat. Die Evaluierung dieses Segmentierungsverfahrens nach einem Schwellenwert erfolgte anschließend anhand des Moduls „Quantification-Threshold“. Mit Hilfe dessen wurden ein unterer und optional ein oberer Schwellenwert festgelegt, welcher den Helligkeitsbereich nach oben weiter einschränkt. Durch schrittweise Prüfung zeigte sich, dass eine semiautomatische Segmentierung nach diesem Prinzip nicht möglich war, da innerhalb der evaluierten Grauwertbereiche das Implantat und der Knochen vom Hintergrund abgegrenzt wurden, aber keine Abgrenzung des Implantats vom Knochen möglich war. Vor allem bei einem direkten Knochen-Implantat-Kontakt wurden die beiden Strukturen an diesem Übergang kontinuierlich miteinander verbunden. Ein Beispiel dafür ist in Abbildung 33 (Pixel im festgelegten Schwellenwertbereich sind rot markiert) dargestellt. Aufgrund dieses Resultats wurde als nächster Schritt zur Festlegung eines potentiell geeigneten Schwellenwertes ein Helligkeits-Histogramm verwendet.



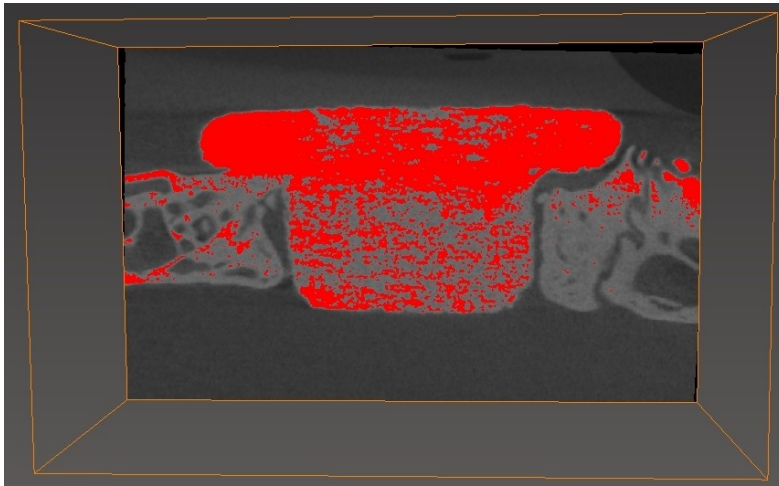


Abbildung 33: Ergebnis der Segmentierung nach einem Schwellenwert von 9367 bis 28557, Markierung den Knochens und Implantats im Datensatz „T 27.3“

### *Auffinden eines geeigneten Schwellenwertes mittels Helligkeits-Histogramm*

Zur Erstellung eines Histogramms für die 3D-Datensätze der Implantate wurde das Modul „Label-Voxel“ in Avizo® Fire 6.3 verwendet. Das Histogramm eines Beispieldatensatzes ist in Abbildung 34 gezeigt und stellt die Anzahl der Voxel und deren zugehörige Helligkeiten dar. Dabei ergaben sich drei Helligkeitsgipfel, die durch schrittweise Evaluation nacheinander den folgenden Strukturen zugeordnet wurden: ein sehr dunkler Bereich (1) aufgrund von Bildartefakten, die calciumphosphatfreien Materialien (2) (Einbettungsmedium, Luft) sowie ein Helligkeitsgipfel der calciumphosphathaltigen Objekte (3) (Knochen und Implantat).

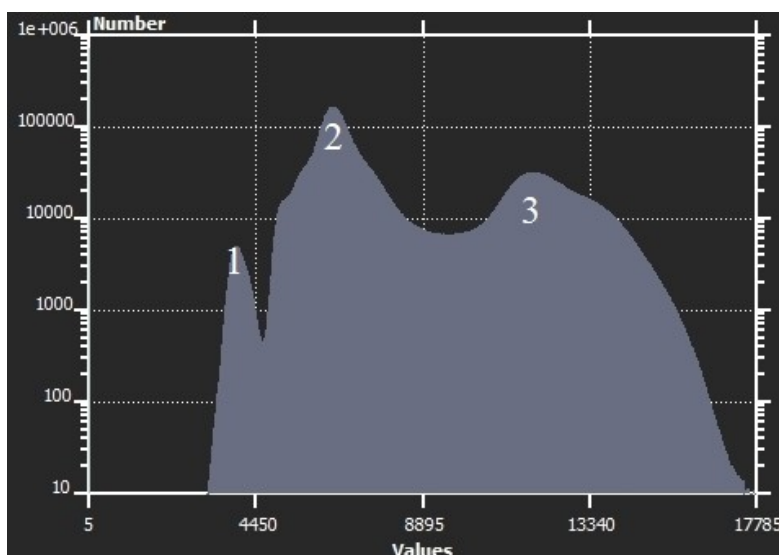


Abbildung 34: Helligkeits-Histogramm für einen 3D-Datensatz, x-Achse: Grauwerte, y-Achse: Helligkeitswerte, Avizo® Fire 6.3

Somit war auch mit Hilfe der in das Modul „Quantification Threshold“ implementierten Schwellenwerte keine semiautomatische Segmentierung der Implantate in den Beispieldatensätzen möglich. Das Ergebnis dieses Arbeitsschritts war ähnlich dem in Abbildung 33 aufgeführten Resultat.

#### 5.4.1.2 Evaluierung des Segmentierungsprinzips der Kantenerkennung

Vor der Anwendung dieses Segmentierungsverfahren wurde ein Kantenerkennungsfiler „Edge Detection Sobel“ eingesetzt, um die Kanten dieser beiden Strukturen hervorzuheben und die Segmentierung zu erleichtern. Das Ergebnis dieses Filterschrittes wird in Abbildung 35 gezeigt, in welcher vorhandene Kanten weiß markiert sind.

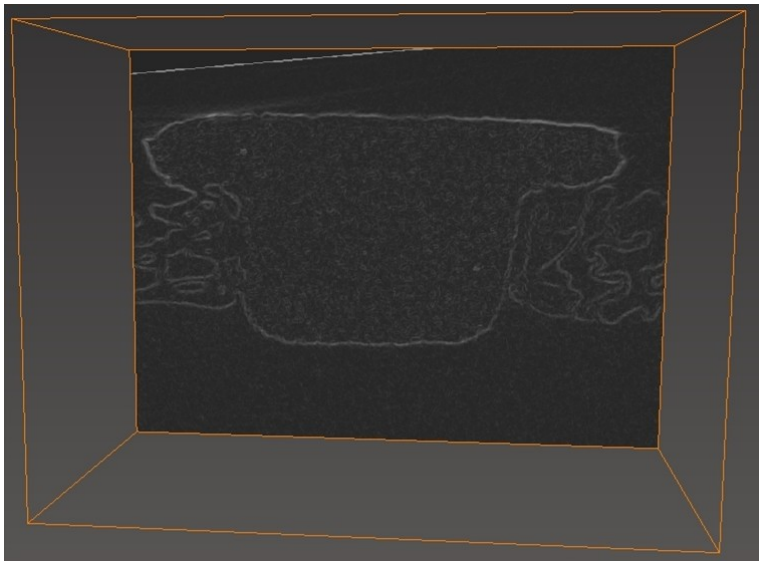


Abbildung 35: Resultat des Edge-Detection-Sobel-Filters, Avizo® Fire 6.3

Anschließend wurde das Segmentierungsprinzip der Kantenerkennung anhand des Moduls „Watershed-Segmentation“ evaluiert. Dieses sollte das Implantat aufgrund deutlicher Helligkeitsunterschiede bzw. Kontraste an den Kanten zum Knochen segmentieren. Hierbei zeigte sich folgendes Ergebnis, welches in Abbildung 36 anhand eines Beispieldatensatzes aufgeführt ist.

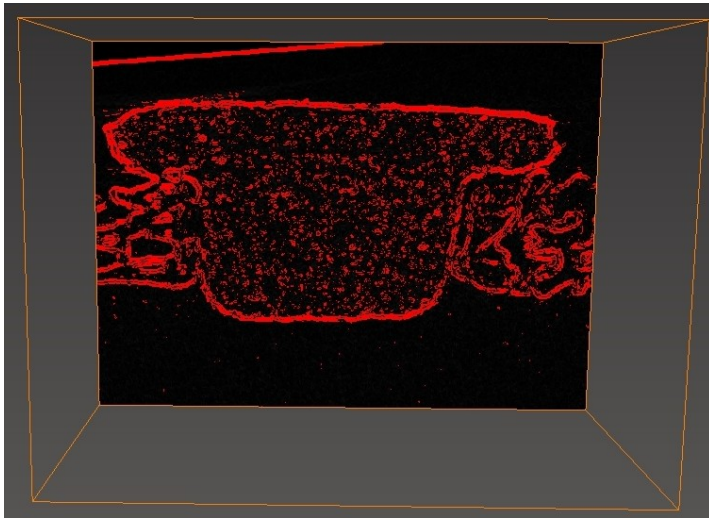


Abbildung 36: Ergebnis der Watershed-Segmentierung, Avizo® Fire 6.3

Das Modul grenzte durch große Helligkeitsänderungen an den Kanten des Knochens und Implantats diese beiden Strukturen gegenüber dem dunklen Hintergrund sowie den sehr dunklen Bereich der Bildartefakte ab. Bei einem direkten Knochen-Implantat-Kontakt wurden diese beiden Objekte kontinuierlich miteinander verbunden ohne die visuell vorhandenen Kanten zu markieren, wodurch eine semiautomatische Segmentierung in diesen Bereichen nicht möglich war.

Ein weiteres Modul mit der Bezeichnung „2D-Histogramm-Segmentation“, welches mit einer Kombination aus einem Schwellenwert und Kantenerkennung segmentiert, ermöglichte ebenfalls nicht die Trennung des Knochens und Implantats.

#### 5.4.1.3 Evaluierung des Segmentierungsprinzips des Region Growings

Das Prinzip des Region Growings (Bereichswachstumsverfahrens) wurde anhand des Segmentierungsmoduls „Label Field“ überprüft. Hierbei wurde ein Pixel innerhalb des Implantats manuell diesem Material zugeordnet und von diesem ausgehend tastete die Funktion die Nachbapixel ab und fügte sie, wenn sie den vorher festgelegten Homogenitätskriterien entsprachen, zum Ursprungspixel des Materials (Implantat) hinzu. Das Ergebnis dieses Prozesses ist in Abbildung 37 anhand eines Beispieldatensatzes dargestellt (homogene Bereiche sind rötlich markiert).

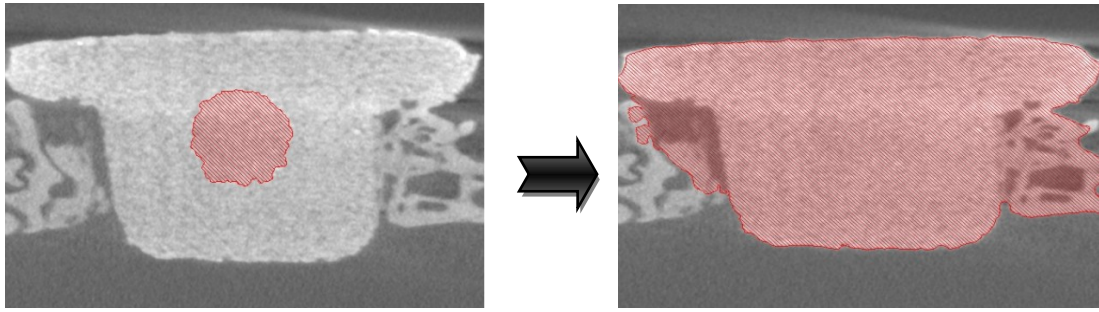


Abbildung 37: Prinzip des Region Growings, Avizo® Fire 6.3

Dabei zeigte sich, dass der Knochen und das Implantat aufgrund der hohen Homogenität in den Grauwerten zu einem Material zugeordnet wurden und eine semiautomatische Segmentierung der Probekörper nicht möglich war.

#### 5.4.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die verschiedenen evaluierten Segmentierungsprinzipien unterschieden allesamt das Implantat und den Knochen vom calciumphosphatfreien Hintergrund. Bezogen auf die 3D-Datensätze der Probekörper konnte keine semiautomatische Segmentierung der TCP-Polymer-Composit-Implantate vom umliegenden Knochen durchgeführt werden. Um die Osseointegration und Biokompatibilität der Probekörper anhand der 3D-Datensätze dennoch zu untersuchen, wurde für diesen Zweck innerhalb der Promotionsarbeit ein neues Verfahren zur Auswertung dieser  $\mu$ CT-Daten unter Verwendung der neu entworfenen Morphometrie-Software „Histo-Gap“ entwickelt.

#### 5.4.2 Entwicklung eines Algorithmus für die Beurteilung der Osseointegration anhand von $\mu$ CT-Datensätzen

Für die Untersuchung der Osseointegration wurde eine vielseitig einsetzbare Methode in Avizo® Fire 6.3 erstellt. Die dafür notwendigen Skripte wurden in Zusammenarbeit mit Peter Westenberger (Westenberger 2012) in die Software implementiert. Mit dieser Methode können Serien virtueller 2D-Schnitte in frei definierbaren Winkelabständen „tortenschnittartig“ durch eine vorgegebene Rotationsachse definiert und als JPEG-Bilder exportiert werden. Dieser Algorithmus kann insbesondere für rotationssymmetrische bzw. annähernd rotationssymmetrische Objekte verwendet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Methode für den Export von virtuellen 2D-Schnitten aus einem 3D-Datensatz eines

bearbeiteten TCP-Polymer-Composit-Implantats mit einer Verweildauer von 9 Monaten getestet. Die erstellten Abbildungen wurden mit der Morphometrie-Software „Histo-Gap“ auf die Osseointegration und Biokompatibilität untersucht.

#### **5.4.2.1 Implementierung zweier neuer Software-Module in Avizo® Fire 6.3**

Eine ausführlichere Auflistung der Arbeitsschritte ist im Anhang unter 9.4. aufgelistet. Die optimalen virtuellen 2D-Schnitte für die Beurteilung der Osseointegration verlaufen durch die Rotationsachse des ausgewählten 3D-Datensatzes des Implantats. Um diese Rotationsachse zu finden, wurde zunächst eine Ebene senkrecht zu dieser Achse definiert. Im Falle des Implantats handelte es sich hierbei um den „Deckel“ bzw. die Oberseite. Die Rotationsachse verläuft innerhalb dieser Ebene senkrecht durch den Mittelpunkt. Für das Auffinden des Mittelpunktes wurde das neu entwickelte Skript „cylinder iv“ in die Software implementiert. Durch Adaptation von Größe und Position eines virtuellen Kreises an den Umriss der Implantat-Oberseite wurde der Mittelpunkt dieser Fläche definiert, durch welche die Rotationsachse des Implantats verläuft. Die grau hervorgehobene Kreisfläche des Skripts ist in Abbildung 38 veranschaulicht.

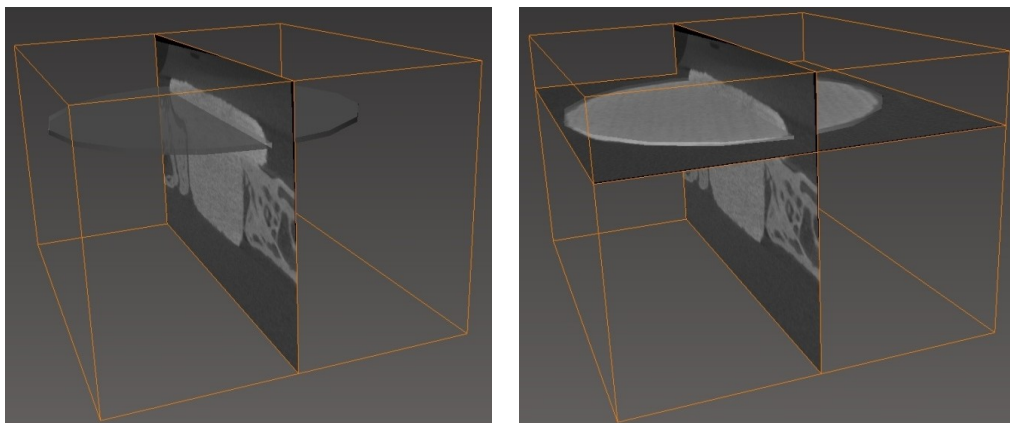


Abbildung 38: Modul zum Auffinden des Mittelpunkts des Implantatdeckels

Die Informationen zu den Koordinaten des Mittelpunkts und der Ebene senkrecht zur Rotationsachse dienen in dem zweiten implementierten Skript „Rotate-Slice“ für die Markierung dieser Achse. Mit Hilfe dieses Moduls waren die folgenden Modifikationen möglich:

1. Eingabe der Koordinaten des Mittelpunkts
2. Ermittlung der Rotationssachse des Implantats

3. Einstellung der Schrittweiten für die Rotation in Winkelgraden „°“
4. Einstellung des Rotationsbereichs in Winkelgraden „°“ für die Drehung des Implantats
5. Erstellung von virtuellen 2D-Abbildungen

Die angefertigten 2D-Abbildungen wurden anschließend mit der Morphometrie-Software „Histo-Gap“ auf die Osseointegration untersucht und die Ergebnisse mit den Hartgewebephistologien desselben Implantats verglichen.

### **5.5 Vergleich der Hartgewebephistologien und der erstellten 2D-Abbildungen des ausgewählten 3D-Datensatzes**

Die erzeugten virtuellen 2D-Schnitte wurden ebenfalls durch die Software „Histo-Gap“ auf die Osseointegration untersucht. Dazu wurden von dem ausgewählten TCP-Polymer-Composit-Implantat die rechte und linke Seite dreier Hartgewebeschnitte mit 31 virtuell erstellten 2D-Schnitten aus dem  $\mu$ CT verglichen. Hierbei wurden die virtuellen Schnitte mit Hilfe der Software Avizo<sup>®</sup> Fire 6.3 in Schrittweiten von 6° erstellt. Zunächst erfolgte die Beurteilung der Regression zwischen der Position eines Messpunktes entlang des Schädelknochens und dem BIC für die Histologie und  $\mu$ CT. Dabei zeigte sich bei den Hartgewebephistologien eine große Streuung und im Vergleich dazu bei den virtuellen 2D-Schnitten der  $\mu$ CT eine verhältnismäßig geringe Varianz der Daten. Aufgrund dieser Problematik wurde auf die Angabe von Regressionskoeffizienten verzichtet. Bei beiden Methoden nahm der Knochen-Implantat-Kontakt bezogen auf den Schädelknochen von außen nach innen ab, wobei dieser Unterschied bei den virtuellen 2-D-Schnitten größer als bei den Hartgewebephistologien war. Bei beiden Methoden zeigte sich eine Häufung der Messpunkte im Bereich von 0-200  $\mu$ m Abstand von der Implantatoberfläche.

Die durchgeführte „Verallgemeinerte Schätzungsgleichungen“ (Generalized Estimating Equations, GEE) ergab bei der 2D-Methode an der Position 50,5  $\mu$ m vom Äußeren des Schädelknochens entfernt einen geschätzten Mittelwert des BICs von 49,33 % (Standardfehler: 0,996 %, Konfidenzintervall 47,37 - 51,30 %). Bei der 3D-Methode wurde der Mittelwert des BICs bei der gleichen Position auf 38,01 % (Standardfehler: 0,996 %; Konfidenzintervall 36,05 – 39,97 %) geschätzt. Dieser Vergleich war mit einem p von < 0,0001 (KI: 8,55 – 14,10 %) statistisch signifikant. Auch unabhängig von der Position eines Messpunktes entlang des Schädelknochens, lieferte die „Verallgemeinerte Schätzungsgleichungen“ für die Hartgewebephistologien einen um 15,00  $\mu$ m geringeren

Abstand zwischen Knochen und Implantat (damit höheren BIC) im Vergleich zur 3D-Methode. Dieses Ergebnis war nicht statistisch signifikant ( $p > 0,05$ ).

## **5.6 Auswertung der Weichgewebhistologien**

Die makroskopische Beurteilung der OP-Gebiete bei der Explantation nach 3, 6 bzw. 9 Monaten war ohne auffälligen Befund und ausgeprägten Entzündungsreaktionen. Die OP-Wunden waren mit geringer Narbenbildung verheilt und der Hautschnitt sowie die Subkutis zeigten eine reizfreie Abheilung.

In die Auswertung wurden 260 Bindegewebschnitte und 286 Hirngewebschnitte sowie 48 Schnitte der implantatfernen Hirngewebsproben einbezogen.

### **5.6.1 Bindegewebhistologien**

#### *3 Monate nach Implantation*

Nach einer Verweildauer von 3 Monaten zeigte sich in allen ausgewerteten Bindegewebschnitten ein reizfreies Gewebe ohne Entzündungs- und Fremdkörperreaktion (Score 0).

#### *6 Monate nach Implantation*

Auch nach dieser Implantationszeit fehlt eine Entzündungs- und Fremdkörperreaktion in den Schnitten (Score 0).

#### *9 Monate nach Implantation*

Ebenso 9 Monate nach Implantation war keine Entzündungs- und Fremdkörperreaktion (Score 0) in den Bindegewebschnitten vorhanden.



### 5.6.2 Hirngewebehistologien

#### *3 Monate nach Implantation*

Nach einer Verweildauer von 3 Monaten zeigte sich in der gesamten Implantat-Gruppe mit der Polymerkomponente UD eine fehlende Entzündungs- und Fremdkörperreaktion (Score 0). Bei den Implantaten mit der Polymerkomponente UM trat eine geringe Entzündungs- und Fremdkörperreaktion auf (Score 2). Hierbei wurde eine Fremdkörperriesenzelle (FKRZ) in einem Hirngewebsschnitt eines nicht bearbeiteten Composit-Implantats gefunden. Diese ist in Abbildung 39 dargestellt und mit einem Kreis gekennzeichnet. Des Weiteren zeigten sich zwei Granulozyten in den Schnitten eines bearbeiteten Composit-Probekörper, wobei ein Beispiel in Abbildung 40 illustriert ist.



Abbildung 39: Fremdkörperriesenzelle, nicht bearbeitetes Composit-Implantats, HE-Färbung, 500fache Vergrößerung



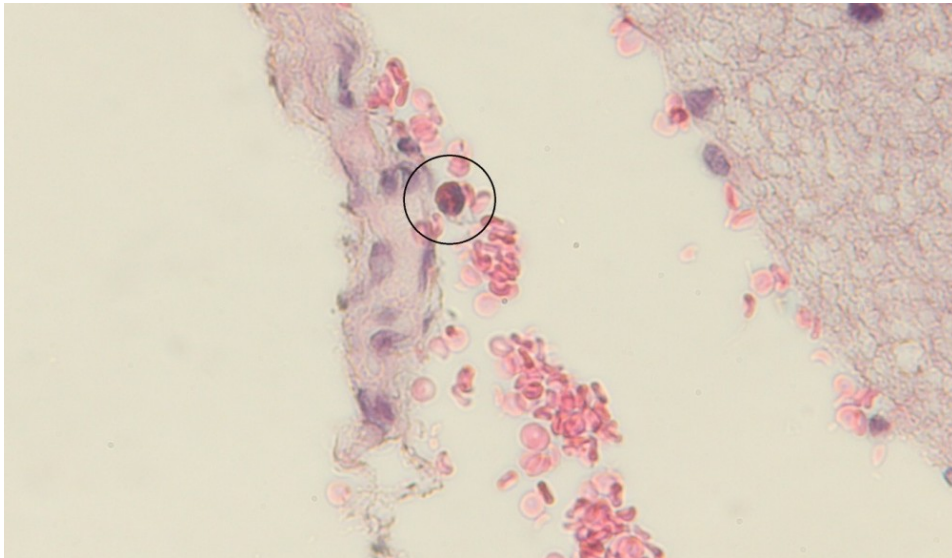


Abbildung 40: Granulozyt, bearbeitetes Composit-Implantat, HE-Färbung, 500fache Vergrößerung

#### *6 Monate nach Implantation*

Auch nach diesem Zeitraum wies die Gruppe mit der Polymerkomponente UD keine Entzündungs- und Fremdkörperreaktion (Score: 0) zu finden. Wiederum trat in den Schnitten bei den Probekörpern mit der UM-Polymerkomponente eine geringe Entzündungs- und Fremdkörperreaktion (Score 1). Dabei wurden jeweils eine Fremdkörperriesenzelle in einem Schnitt der Polymer-Kontrolle und einem nicht bearbeiteten Composit-Implantat gefunden. Abbildung 41 stellt eine dieser Zellen mit einem Kreis markiert dar.

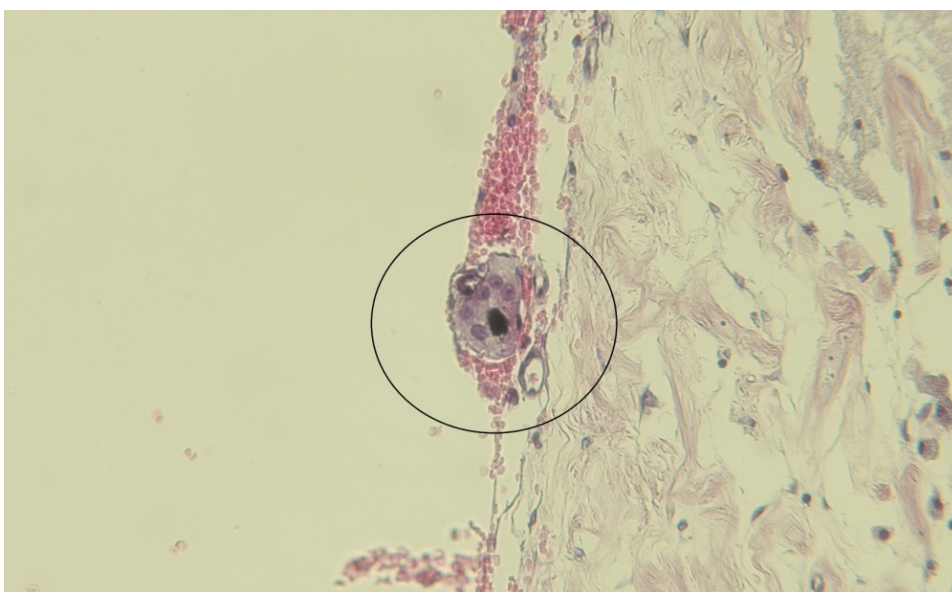


Abbildung 41: Fremdkörperriesenzelle, nicht bearbeitetes Composit-Implantat, HE-Färbung, 500fache Vergrößerung

### *9 Monate Verweildauer*

Nach einer Implantationszeit von 9 Monaten wurde in keiner der Implantat-Gruppen eine Entzündungs- und Fremdkörperreaktion gefunden (Score 0).

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Hirngewebsschnitte ist in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 10: Zusammenfassung der Ergebnisse der Hirngewebsschnitte

	Verweildauern	Anzahl Granulozyten	Anzahl FKRZ	Score
UM-Implantate	3	2	1	1
	6	0	2	1
	9	0	0	0
UD-Implantate	3	0	0	0
	6	0	0	0
	9	0	0	0

### **5.6.3 Implantatferne Hirngewebeproben**

#### *3 Monate nach Implantation*

Nach dieser Implantationszeit von 3 Monaten trat in allen ausgewerteten Schnitte war eine Entzündungs- und Fremdkörperreaktion (Score 0) auf.

#### *6 Monate nach Implantation*

Auch nach einer Verweildauer von 6 Monaten fehlte eine Entzündungs- und Fremdkörperreaktion (Score 0) in den untersuchten Schnitten.

#### *9 Monate nach Implantation*

9 Monate nach Implantation zeigte sich ein reizfreies Gewebe ohne Entzündungs- und Fremdkörperreaktion (Score 0).

## **6      Diskussion**

Die Grundlage der vorliegenden Arbeit bildete eine tierexperimentelle Studie, in welcher vier zylindrische Implantate in die Schädelkalotte von 18 NZW-Kaninchen nach dem „Jenaer Schädelmodell“ eingebracht wurden. Dazu erfolgte die Unterteilung dieser Tiere in zwei gleich große Gruppen, wobei jedes Versuchstier in den beiden Gruppen zwei Probekörper aus einem Composit und zusätzlich ein Kontroll-Implantat aus einem Tricalciumphosphat (TCP) erhielt. Die Kaninchen der beiden Gruppen unterschieden sich untereinander in der Polymerkomponente der Composite, wodurch jeweils die eine Hälfte der Versuchstiere ein Composit-Implantat aus einem Monomethylacrylat (Copolymer aus UDMA und UM) und die andere Hälfte ein Composit-Implantat aus einem Dimethacrylat (Copolymer aus UDMA und UD) zugeteilt bekam. Die Materialien wurden nach 3, 6 und 9 Monaten zusammen mit dem umliegenden Knochen- sowie Binde- und Hirngewebe explantiert. Die Knochenstücke mit den Implantaten wurden entwässert und in Kunststoff eingebettet. Von diesen Blöcken wurden  $\mu$ CT-Scans angefertigt und 3D-Datensätze erstellt. Anschließend erfolgte die Anfertigung von Hartgewebhistologien mittels Trenn-Dünnschliff-Technik nach Donath und das Anfärben der Proben (Donath und Breuner 1982). Die Binde- und Hirngewebspräparate wurde mittels Weichgewebhistologie untersucht.

Anhand der vorliegenden 3D-Datensätze und Histologien wurden die Osseointegration, Funktionalität und Biokompatibilität der Implantate untersucht. Diese Beurteilung erfolgte mit Hilfe verschiedener Auswertungsmethoden, wie der Beurteilung der Resorption der TCP-Implantate sowie die morphometrische Auswertung des Knochen-Implantat-Kontakts (bone-implant-contact, BIC) und Knochen-Implantat-Abstandes in den Hartgewebhistologien und 3D-Datensätzen. Außerdem wurde die Entzündungs- und Fremdkörperreaktion in den Weichgewebhistologien per Score evaluiert.

### **6.1      Diskussion der Methode**

#### **6.1.1    Beurteilung der Weichgewebhistologien mit Hilfe eines Scores**

Die Reaktion des Weichgewebes auf die eingesetzten Materialien wurde in den Bindegewebe- und Hirngewebhistologien anhand der Entzündungs- und Fremdkörperreaktion untersucht. Für die Beurteilung der Entzündungsreaktion erfolgte die numerische Bestimmung der Anzahl an Granulozyten. Dafür wurde ein eigener Score verwendet, welcher z.T. auf einer

Einteilung nach Santos basierte (Santos et al. 2012). Der Autor beschrieb das Ausmaß der Entzündungsreaktion mit den Worten „fehlend“, „diskret“, „moderat“ und „intensiv“, wobei eine quantitative Aussage fehlt und dieser Score eher subjektiv ist. Daher erfolgte innerhalb dieser Promotionsarbeit die Ergänzung dieses Scores durch Zellzahlenbereiche, wodurch sowohl eine quantitative als auch eine qualitative Analyse der Entzündungsreaktion in den Weichgewebesthistologien möglich war. Ähnlich der vorliegenden Arbeit beschrieben Sethuraman et al. die Anzahl an Granulozyten nach der Implantation sowie Parker die Anzahl an Fibroblasten und das Ausmaß einer fibrösen Kapsel quantitativ und qualitativ (Parker et al. 2002, Sethuraman et al. 2006). Des Weiteren versuchten Parker et al. mit Hilfe zweier unabhängiger Untersucher zum Zählen der Zellen die Objektivität der Ergebnisse zu steigern (Parker et al. 2002). Diese Möglichkeit wurde auch im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit stichprobeartig durch zwei Untersucher zur Überprüfung der Zellzahlen genutzt. Im Vergleich zur Promotionsarbeit beschrieben Cavalcanti et al. und Kuemmerle et al. (Kuemmerle et al. 2005, Cavalcanti et al. 2008) qualitativ nach dem „ja-nein-Prinzip“ das Vorliegen einer Entzündungsreaktion. Dabei ist zu beachten, dass diese Methode eher subjektiv und stärker untersucherabhängig sowie weniger stark reproduzierbar ist. Daher erfolgte innerhalb dieser Promotionsarbeit zur Steigerung der Validität die qualitative und quantitative Beurteilung der entzündlichen Reaktion.

Neben der Bestimmung der Granulozytenzahl wurde die Anzahl an Fremdkörperriesenzellen (FKRZ) zur Beurteilung der Fremdkörperreaktion numerisch erfasst und ausgewertet. Da insgesamt nur wenige dieser Zellen vorhanden waren, wurde eine quantitative Analyse als ausreichend erachtet. Dabei erfolgte die Beobachtung dieser zellulären Strukturen anhand von Weichgewebeschnitten bei einer definierten Vergrößerung. Ebenfalls mikroskopisch untersuchten andere Autoren diese Zellen zur Beurteilung einer Fremdkörperreaktion (Goodman et al. 1991, Batniji et al. 2002, Kuemmerle et al. 2005, Grossterlinden et al. 2006, Sethuraman et al. 2006, Bitschnau et al. 2009, Alt et al. 2011). Daneben kann das Vorhandensein von Gewebszellen mit immunhistochemischen Methoden erfolgen, wobei die gesuchten Strukturen z.B. durch Antikörper oder Markerenzyme spezifisch gekennzeichnet werden (Witte et al. 2007, Ren et al. 2008, de Freitas Costa et al. 2009). Diese Vorgehensweise kann die Trefferquote und Objektivität in den histologischen Präparaten erhöhen. Innerhalb der Promotionsarbeit wurde diese Methode nicht verwendet, da die technischen Möglichkeiten nicht bestanden und die semiautomatische Erfassung der Fremdkörperriesenzellen für die Zielstellung ausreichte.

## **6.1.2 Hartgewebephistologien**

### **6.1.2.1 Auswertung mit Hilfe eines Scores**

Neben der Beschreibung von Entzündungsreaktionen in Weichgewebephistologien kann ein Score auch für Zustandsbeschreibungen in Hartgewebephistologien genutzt werden. Dazu gehören z.B. die Beurteilung der Knochenregeneration, des Knochenverbundes, die Knochenmineralisation oder die Resorption eines Materials (Alberius et al. 1990, Isaksson et al. 1993, Shand et al. 2002, Findikcioglu et al. 2009, Brandt et al. 2010). Ein Score konnte zur Beurteilung der Osseointegration der Hartgewebephistologien nicht genutzt werden, da diese Methode einen Zustand mit Worten bzw. Zahlen subjektiv beschreibt. Das Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war eine histomorphometrische und softwareunterstützte Auswertung der Präparate. Dennoch wurde für die Detektion des Resorptionsgrades der Kontroll-Implantate aus dem Tricalciumphosphat (TCP) ein qualitativer Score verwendet, da keine geeignete Software zur Verfügung stand, es sich um Vergleichsproben handelte, das biologische Verhalten von TCP bekannt war und die wenigen histologischen Schnitte dieser Kontrollen in einem vertretbaren Zeitraum untersucht werden konnten.

### **6.1.2.2 Histomorphometrie**

Histomorphometrische Messungen sind die Grundvoraussetzung für eine statistische Analyse von Ergebnissen und erlauben eine reproduzierbare, standardisierte Auswertung der Daten und den Vergleich mit der Literatur. Dabei kann die Datenerhebung manuell bis vollautomatisch erfolgen. Eine softwareunterstützte Erhebung von histomorphometrischen Parametern nutzten zahlreiche Autoren zur Untersuchung der Osseointegration von Implantatmaterialien im Schädelbereich (Gaggl et al. 2000, Trisi et al. 2002, Marechal et al. 2005, von Wilmosky et al. 2008, Orsini et al. 2009, Martini et al. 2011). Orsini et al. und von Wilmosky et al. untersuchten softwareunterstützt den Knochen-Implantat-Kontakt (bone-implant-contact, BIC). Dabei unterteilten von Wilmosky et al. mit Hilfe der Software „Bioquant Osteo“ den Bereich um die verwendeten Titanimplantate in acht Region of Interests (ROI). Orsini et al. hingegen setzten softwareunterstützt und standardisiert Landmarken entlang der Oberfläche von Titanimplantaten. Diese beiden technischen Methoden waren innerhalb der vorliegenden Promotionsarbeit nicht realisierbar gewesen, da die Implantate irregulär geformt und zum Teil eine angefräste Oberfläche besaßen. Marechal

et al. unterschieden zusätzlich mit Hilfe einer Software den neuen Knochen vom bestehenden Schädelknochen. Dieser Lösungsansatz wäre aufgrund des fehlenden Standards zur Knochenmarkierung innerhalb dieser Promotionsarbeit keine Möglichkeit zur Beantwortung der Fragestellung gewesen. In Folge der aufgeführten Schwierigkeiten zur Messung des BICs in dieser Dissertation wurde die neue Morphometrie Software „Histo-Gap“ entwickelt. Diese diente zur Messung der Abstände zwischen verschiedenen Strukturen, wobei die Datenerhebung sowie -auswertung flexibel und ergonomisch möglich war. Diese Software schaffte damit die Voraussetzung zur Bestimmung der Osseointegration anhand des BICs und Knochen-Implantat-Abstandes in den Hartgewebeshistologien und die statistische Auswertung der erhobenen Ergebnisse. Dies ermöglichte wiederum den Vergleich mit den Resultaten anderer Autoren.

Der BIC wurde als histomorphometrischer Parameter für die vorliegende Arbeit ausgewählt, da er ein Grundparameter für die Beurteilung der Biokompatibilität, Osseointegration und Langzeitstabilität von Permanentimplantaten im Bereich der Schädelkalotte verschiedener Tiermodelle ist (Trisi et al. 2002, Park et al. 2005, von Wilmosky et al. 2008, Pieri et al. 2010, Zhou et al. 2010, Alt et al. 2011, Martini et al. 2011). Hierbei fällt zunächst auf, dass alle Autoren eine softwareunterstützte Erhebung des BICs durchführten, da eine manuelle Messung sehr zeitaufwändig ist. Daher wurde der BIC auch im Rahmen dieser Arbeit zur Vergleichbarkeit softwareunterstützt erhoben. Von Wilmosky et al. und Trisi et al. führten die folgenden Einflussfaktoren für das Ausmaß an BIC auf: z.B. die Oberfläche und Rauheit eines Materials, das Tiermodell, die Implantationszeit und der -ort. Diese Aspekte müssen beim Vergleich mit anderen Arbeiten berücksichtigt werden. So wurden die Implantate der vorliegenden Promotionsarbeit in die Schädelkalotte von Kaninchen eingesetzt, wobei es sich um einen Plattenknochen handelt. Dadurch können die Ergebnisse weniger valide mit denen von Röhrenknochen verglichen werden können. Dennoch repräsentiert der BIC am ehesten das physiologische Verhalten des Knochens im Bereich der Schädelkalotte, weshalb dieser Parameter ausgewählt wurde. Daneben führten die genannten Autoren die Abhängigkeit des Ausmaßes an BIC von der Einheilungszeit eines Implantates auf. Um diese Abhängigkeit zu überprüfen, ist es günstig diesen Parameter nach verschiedenen Implantationszeiträumen zu erheben. Dies erfolgte im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit durch die Untersuchung des direkten Knochen-Implantat-Kontakts nach 3, 6 und 9 Monaten. Weiterhin erkannten Trisi et al. eine andere Schwierigkeit dieser histomorphometrischen Größe: der BIC sagt sehr wenig über die Stärke des umliegenden Knochens und damit der Stabilität gegenüber einwirkenden Kräften aus. Dieses Problem konnte auch innerhalb dieser Promotionsarbeit

bestätigt werden, da ein direkter Knochenkontakt ebenfalls bei einem sehr dünnen Knochensaum um ein Implantat bestimmt werden konnte, wobei die Stabilität und Integration des Probekörpers in den Knochen eher fraglich sind. Daher sollte in nachfolgenden Studien der umliegenden Knochen genauer betrachtet und das Knochenvolumen bestimmt werden. Aufgrund dieser Angaben ist der BIC eine geeignete Größe zur Evaluation der Osseointegration im Schädelbereich, wobei die Vor- und Nachteile dieses Parameters bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen.

Um zusätzliche Hinweise auf die Biokompatibilität eines Materials zu erhalten, untersuchten andere Autoren weitere histomorphometrische Parameter wie z.B. das Knochenvolumen, die Trabekeldicke (Trisi et al. 2002, Yeom et al. 2008, Mino-Farina et al. 2009, Martini et al. 2011), die Knochenmineralisierungsrate oder führten dynamische Knochenanalysen mit Fluoreszenzfarbstoffen durch (Gaggl et al. 2000, Clark 2002, Roy et al. 2003, Wehrhan et al. 2012). Diese Parameter wurden innerhalb der vorliegenden Arbeit nicht erhoben, da sie nicht der Fragestellung dieser Promotionsarbeit entsprachen und aufgrund der morphologischen Struktur des Schädelknochens nicht erhoben werden konnten. Um weitere Hinweise auf die Osseointegration zu erhalten, wurde zusätzlich der Knochen-Implantat-Abstand in den Hartgewebeshistologien evaluiert. Damit sollte das Anwendungsspektrum der Software „Histo-Gap“ erweitert werden, um in nachfolgenden Versuchen die Abstände oder Breiten von anderen Strukturen wie z.B. Schleimhäuten und Knorpel zu ermitteln. Aus einer Arbeit von Offer et al. geht einerseits hervor, dass der BIC und der Knochen-Implantat-Abstand inverse Parameter sind und andererseits, dass mit zunehmender Bindegewebsdicke der BIC abnimmt (Offer et al. 2011). Diesen Aspekt führten auch Martini et al. auf, die bei vorhandenen Bindegewebe einen abnehmenden BIC beobachteten (Martini et al. 2011). Die erhobenen Ergebnisse der Autoren werden durch die Resultate der vorliegenden Arbeit bestätigt. Aufgrund dessen wurde bei vorhandenem Knochen-Implantat-Abstand eine Bindegewebsschicht zwischen diesen beiden Strukturen angenommen und die Dicke dieser Schicht nicht als zusätzlicher Parameter erhoben.

Damit standen für die nicht resorbierbaren Materialien eine Reihe von Parametern zur Untersuchung der Biokompatibilität zur Verfügung, wobei für jeden Implantationsort spezifische repräsentative Parameter existierten.

Im Gegensatz dazu können auch histomorphometrische Größen für resorbierbare Materialien wie das im Rahmen dieser Arbeit verwendete TCP erhoben werden. Dazu gibt es in der Literatur verschiedene Möglichkeiten die Resorption zu untersuchen. Dies kann von einer verbalen Beschreibung und quantitativen Angabe von Prozenten bis zur softwareunterstützten

Analyse reichen (Clokier et al. 2002, Cavalcanti et al. 2008, Xu et al. 2008, Mino-Farina et al. 2009, Brandt et al. 2010, Schneider et al. 2010). Cavalcanti et al. und Schneider et al. führten eine verbale Beschreibung der Resorptionsvorgänge von Calciumphosphatzementen auf. Schneider et al. beschrieben das Geschehen beispielsweise mit den Worten „zunehmende Resorption“, „intensive Knochenneubildung fand statt“ oder „kein Auftreten von neuen Knochen“. Cavalcanti et al. nutzen den folgenden Wortlaut: „Gebiete mit Knochenumbau und –neubildung, Knochenresorption in den Defekten“. Diese Vorgehensweise genügt der Fragestellung dieser Promotionsarbeit nicht und wurde als zu ungenau, wenig vergleichbar und subjektiv erachtet. Brandt et al. hingegen untersuchten die Resorption und Osseointegration des Hydroxylapatits Ostim® im distalen Oberschenkel von Kaninchen. Sie gaben dabei fünf Resorptionsgrade mit teilweiser Prozentangabe des Ausmaßes der Resorption an. Diese Bearbeitung entsprach der Anforderung dieser Dissertation, weshalb der Score von Brandt modifiziert wurde und die Resorption der Kontrollimplantate aus TCP für eine genaue Beurteilung vollständig in Prozenten angegeben wurde. Im Gegensatz dazu nutzten Xu et al., Clokier et al. und Mino-Farina et al. die softwareunterstützte Analyse der Resorption dieses Materials und das Vorhandensein von Restimplantat. Dabei registrierte die genutzte Software den knöchernen Defekt und berechnete den Anteil der restlichen vorhandenen Strukturen. Dieses Prinzip konnte innerhalb dieser Promotion nicht genutzt werden, da es keinen Standard zur Kennzeichnung von neuen und alten Knochen gab. Dennoch können durch den standardisierten Score nach Brandt et al. die erhobenen Ergebnisse für den Vergleich mit der Literatur genutzt werden.

### **6.1.3 $\mu$ CT**

Innerhalb der vorliegenden Promotionsarbeit wurden  $\mu$ CT-Scans der entnommenen Implantate mit dem umliegenden Gewebe ausgewertet. Vorteile dieser Methode sind die verlustfreie Abbildung der gesamten Knochen-Implantat-Oberfläche und die Möglichkeit zur Beurteilung der Knochenstruktur (Chappard et al. 2005, Park et al. 2005, Thomsen et al. 2005, Stadler et al. 2006, Yeom et al. 2008, Cha et al. 2009, Efeoglu et al. 2009). Die Schwierigkeiten bei dieser Methode bestehen in der Datenauswertung, der softwareunterstützten Erhebung von Parametern und Gewinnung möglichst vieler Informationen aus den 3D-Datensätzen (Kiba et al. 2003, Park et al. 2005, Cha et al. 2009). Dazu sollte in der vorliegenden Promotionsarbeit der BIC in den 3D-Datensätzen der TCP-Polymer-Composit-Implantate mit Hilfe der Software Avizo® Fire 6.3 gemessen werden. Für



diese Zielstellung mussten die Implantatmaterialien vom umliegenden Knochen abgegrenzt werden. Dafür existierte bisher kein Standard, weshalb nach einem Lösungsweg mit Hilfe der Evaluierung verschiedener Segmentierungsprinzipien gesucht wurde. Zu diesen gehörten das Schwellenwertverfahren, die Watershed-Segmentierung und das Region Growing. Die Schwellenwert-Segmentierung wird von vielen Autoren als Basisschritt zur Trennung von Objekten angewendet (Follet et al. 2005, Marechal et al. 2005, Stoppie et al. 2005, Butz et al. 2006, Efeoglu et al. 2009). Dabei kamen Stoppie et al., Butz et al. und Efeoglu et al. zu dem Entschluss, dass die Qualität des Ergebnisses der Segmentierung von dem gewählten Schwellenwert abhängt. Ein zu hoch gewählter Wert führt zu einem unvollständig segmentierten Objekt und ein zu niedriger Wert zu einer Einbeziehung nicht dazugehöriger Volumenanteile, die mit anderen Softwaremodulen entfernt werden müssen. Diese Schwierigkeit wurde ebenfalls innerhalb dieser Promotionsarbeit beobachtet, weshalb im Rahmen dieser Dissertation zunächst getestet wurde, ob ein geeigneter Schwellenwert durch zusätzliche manuelle Adaptation definiert werden kann. Nachdem sich gezeigt hatte, dass dieses Verfahren für die vorliegenden Daten nicht geeignet war, wurde die Kantenerkennung nach dem Watershed-Prinzip zur Trennung des Knochen und Implantats evaluiert. Heath et al. und Peter et al. nutzten ebenfalls dieses Prinzip (Heath et al. 2008, Peter et al. 2008). Dabei stellten Heath et al. fest, dass die Kanten an den Grenzen der Objekte bei dem Watershed-Prinzip verbunden sein müssen und dass die Eigenschaften eines Objektes im gesamten Bild sehr ähnlich sein müssen (Heath et al. 2008). Dies traf in den Untersuchungen der vorliegenden Promotionsarbeit auf die Implantate und den Knochen bei vorhandenem Abstand zu. Im Falle eines direkten Knochen-Implantat-Kontakts waren die Kanten der beiden Strukturen nicht mehr eindeutig identifizierbar und diskontinuierlich, was die Segmentierung erheblich erschwerte.

Als nächstes wurde an den vorliegenden Datensätzen das Segmentierungsprinzip des Region Growings getestet. Einige Autoren wendeten dieses Prinzip erfolgreich zur Trennung von Strukturen und Berechnung von Parametern an (Larsen et al. 2006, Peter et al. 2008, Egger et al. 2012). Sie erkannten dabei, dass die Qualität des Ergebnisses des Region Growings stark von der Definition eines optimalen Startpunkts („Ausgangssaatpunkt“) abhängt und dass dieser mit Hilfe der Helligkeitsverteilung in einem Histogramm gefunden werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Pixel im Composit-Implantat als Saatpunkt gewählt, da dieses segmentiert werden sollte. Dennoch wurde der umliegende Knochen als ein dem Implantat homogenen Material durch diesen Algorithmus erkannt.

Bei der Evaluation der verschiedenen Segmentierungsprinzipien bestand innerhalb der vorliegenden Promotionsarbeit zu jeder Zeit das folgende Problem: sowohl der Knochen als auch die Composit-Implantate enthielten Calciumphosphat in ähnlichen Konzentrationen und besaßen deshalb sehr homogene Grauwerte in den 3D-Datensätzen. Diese Schwierigkeit zeigte sich im Helligkeitshistogramm, in welchem der Knochen und das Composit-Material einen gemeinsamen Helligkeitspeak besaßen. Dies führte vor allem im Bereich von direktem Knochen-Implantat-Kontakt zur Überlappung der Grauwerte beider Materialien. Damit wurden der Knochen und das Implantat von den Segmentierungsalgorithmen als einheitliche Objekte erkannt, weshalb keine semiautomatische, sondern nur manuelle Segmentierung möglich war. Auf dieses mögliche Problem wiesen auch Peter et al. und Chopra et al. in ihrer Arbeit hin (Peter et al. 2008, Chopra et al. 2009). Da die manuelle Segmentierung sehr zeitaufwendig ist, wurden virtuelle 2D-Schnitte der Implantate erstellt und innerhalb der Morphometrie-Software „Histo-Gap“ ausgewertet. Ein möglicher Lösungsansatz für das Problem einer effizienten Segmentierung der vorliegenden Datensätze könnte eine texturbasierte Segmentierung sein, wie sie z.B. Muthu Rama Krishnan et al. anwendeten (Muthu Rama Krishnan et al. 2011). Der für die Röntgendichte relevante Calciumphosphat-Anteil des Composit-Implantatmaterials hat eine mikroporöse Struktur, die in den virtuellen Schnitten der  $\mu$ CT-Datensätze als Textur erkennbar ist. Kompakter Knochen erscheint dagegen eher glatt. Auf dieser Grundlage soll basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Promotionsarbeit in Zusammenarbeit mit Herrn Westenberger (Westenberger 2012) ein Algorithmus erstellt werden, der diese Textur des Implantats als signifikantes Merkmal erkennt und für die Segmentierung dieses Materials vom umliegenden Knochen ausnutzt.

## **6.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **6.2.1 Auswahl des Tiermodells**

Das Tiermodell Kaninchen ist ein etabliertes Modell für Studien im Schädelbereich und wird häufig für die Evaluation von Knochenersatzmaterialien eingesetzt. Die Tiere benötigen nur einfache Haltungsbedingungen, sind wenig anspruchsvoll und robust gegen operativen Stress sowie Infektionen und erreichen ihre skelettale Reife nach ca. 6 Monaten (Clokier et al. 2002, Fisher et al. 2002, Shand et al. 2002, Liebschner 2004, Pearce et al. 2007, Cavalcanti et al. 2008, Xu et al. 2008, Yeom et al. 2008, Schneider et al. 2010). Die Anzahl an eingesetzten Versuchstieren schwankt im Vergleich zu der vorliegenden Arbeit in der Literatur von

wenigen (6) bis vielen (50) Tieren (Clokier et al. 2002, Shand et al. 2002, Simon et al. 2007, Cavalcanti et al. 2008, Xu et al. 2008, Yeom et al. 2008, Bauer et al. 2009, Schneider et al. 2010). Die Anzahl der Versuchstiere wird z.B. durch die Überlebensrate, der Fragestellung eines Experiments und der Reaktion auf den operativen Stress bestimmt. Vor allem aus ethischen Gründen muss die Menge an Versuchstieren möglichst gering gehalten werden, weshalb so viel wie möglich Informationen aus dem Modell genutzt werden müssen (Holmes et al. 2010, Flecknell 2002). Die Anzahl von 18 Versuchstieren bzw. 6 Kaninchen je Zeitraum wurde in der vorliegenden Arbeit gewählt, da beim möglichen Versterben eines Tieres die zur Verfügung stehende Datenmenge weiterhin statistisch auswertbar wäre. Dementsprechend wurde nach dem Prinzip „so viel wie nötig, so wenig wie möglich“ agiert.

Aufgrund der zahlreichen Erfahrungen in der Literatur und der Eignung für die Zielstellung wurde dieses Tiermodell auch innerhalb der vorliegenden Promotion verwendet. Dennoch müssen beim Einsatz dieses Modells verschiedene Schwierigkeiten berücksichtigt werden. Beispielsweise führen Pearce et al. 2007 auf, dass die Größe und Anzahl der Implantate durch die Schädelgröße der Kaninchen limitiert ist. Aufgrund dessen konnten in dieser Studie maximal vier Implantate in die Schädelkalotte eingebracht werden. Daneben weisen Peri et al. auf die im Vergleich zum Menschen höhere Knochenumbaurate hin, die in den Kaninchen zu einer höheren Osseointegration führt (Pieri et al. 2010). Zusätzlich zu diesem Aspekt ist die Knochenregeneration in Jungtieren höher als bei älteren Tieren, worauf Liebscher et al. hinwiesen (Liebschner 2004). Die Schwierigkeit bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Tieren bestand darin, dass die Kaninchen zwischen 4 - 6 Monaten alt waren und die Implantation somit in den wachsenden Schädelknochen erfolgte. Diese Tatsache ließ sich aufgrund der maximalen Implantationsdauer von 9 Monaten und der begrenzten Lebensdauer der Kaninchen nicht vermeiden. Damit können die gewonnenen Ergebnisse dieses Tiermodells nicht exakt auf die physiologischen Bedingungen im erwachsenen Menschen übertragen werden. Diesen Fakt diskutierten ebenfalls von Wilmowsky et al. sowie Peri et al. und fügten hinzu, dass dies auch zu Schwierigkeiten im Vergleich zwischen den verschiedenen Tiermodellen führt (von Wilmowsky et al. 2008, Pieri et al. 2010). Daher können nur die Ergebnisse gleicher Tiermodelle valide miteinander verglichen werden.

Im Vergleich zum Tiermodell Kaninchen setzten andere Autoren z.B. Ratten, Hunde, Schafe und Ziegen ein (Gaggl et al. 2000, Gosain et al. 2003, Kuemmerle et al. 2005, Al-Nawas et al. 2006, Schliephake und Scharnweber 2008, de Freitas Costa et al. 2009). Beispielsweise waren Ratten für den vorliegenden Versuch nicht geeignet, da die Schädelgröße für die Implantate zu klein war (Pearce et al. 2007). Einige größere Tiermodelle sind dem menschlichen

Knochen in ihrer Struktur und Umbaurate zum Teil ähnlicher, wohingegen die Haltungskosten höher und Haltungsbedingungen schwieriger als bei kleinen Tieren sind (Liebschner 2004, Pearce et al. 2007). Aufgrund dessen ist das Tiermodell Kaninchen für die in dieser Promotionsarbeit bearbeiteten Fragestellung am besten geeignet.

### **6.2.2 Entzündungs- und Fremdkörperreaktion in den Weichgewebeshistologien**

Bei der Auswertung der Weichgewebeshistologien zeigten vor allem die Bindegewebspräparate der Materialien nach 3, 6 und 9 Monaten eine sehr geringe Entzündungs- und Fremdkörperreaktion. Ebenso waren die Hirngewebeproben durch eine insgesamt geringe Reaktion auf die Implantation gekennzeichnet (Score 1), wobei vor allem bei den Composit-Implantaten mit der Polymerkomponente UM wenige Granulozyten auftraten. Damit rufen die eingesetzten Komponenten UM und UD eine extrem geringe Entzündungsreaktion hervor, da die gezählten Zellen nur einzeln in den Präparaten vorkamen. Damit konnte die Biokompatibilität der evaluierten Materialien bestätigt werden. Aufgrund der einzigartigen Kombinationsweise der Compositmaterialien ist die direkte Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen anderer Autoren eingeschränkt. Daher sollten die Resultate mit anderen häufig eingesetzten Knochenersatzmaterialien verglichen werden. Beispielsweise wird Titan regelmäßig in unterschiedlichen Konfigurationen zum Knochenersatz im Kaninchen-Schädel verwendet (Marechal et al. 2005, Min et al. 2008). Die Autoren bestätigten in ihren Experimenten die gute Biokompatibilität und Handhabung des Titans. Aufgrund dessen wird Titan im Rahmen nachfolgender Studien des Labors als Kontrolle verwendet.

Häufig werden auch Hydroxylapatite (HA) und Glaskeramiken in unterschiedlichen Zusammensetzungen in die Schädelkalotte implantiert. Dabei führten Roy et al. vor allem die poröse Struktur des HAs und damit das osteokonduktive Einwachsen des Knochens als großen Vorteil und Voraussetzung für die Biokompatibilität dieses Materials auf (Roy et al. 2003). Die genutzten Implantatkörper aus TCP besaßen eine poröse Struktur, welche durch die Infiltration mit den Monomeren UM und UM aufgehoben wurden. Dadurch verblieben diese Compositimplantate stabil in dem Knochendefekt. Im Gegensatz zu Roy et al. lehnten Moreira-Gonzalez et al. die alleinige Nutzung von bioaktiven Gläsern zur Auffüllung von großen Schädeldefekten ab, da die von ihnen verwendeten Bioglaspartikel durch Resorption und Einwanderung in das im Gewebe eine Entzündungsreaktion hervorriefen (Moreira-Gonzalez et al. 2005). Sie empfahlen zur Steigerung der Verträglichkeit dieser Glaskeramiken die Kombination mit autogenen Knochen oder Stammzellen. Bei der Interpretation der

unterschiedlichen Ergebnisse muss beachtet werden, dass es bisher sehr viele Biogläser gibt, deren unterschiedliche Zusammensetzungen Auswirkungen auf ihre Biokompatibilität haben. Das ebenfalls häufig zum Knochenersatz verwendete Polymer PEEK (Polyetheretherketon) zeigt eine gute Gewebsverträglichkeit, wie z.B. Hallahb et al. und Rivard et al. im Spinalkanal von Kaninchen bestätigten (Rivard et al. 2002, Hallab et al. 2013). Sie zeigten in ihrem Versuch, dass dieses Material eine sehr geringe Immunreaktion mit sehr wenigen Fremdkörperriesenzellen hervorruft.

Anhand der vorliegenden Promotion lässt sich schlussfolgern, dass die Gewebsverträglichkeit der hier evaluierten Composit-Implantate vergleichbar mit der guten Biokompatibilität verschiedener etablierter Knochenersatzmaterialien ist.

### **6.2.3 Hartgewebhistologien**

#### **6.2.3.1 Kontroll-Implantate aus TCP**

Über die betrachteten Zeiträume von 3, 6 und 9 Monaten nahm die Resorption der TCP-Implantate stetig zu. Damit wurde der Großteil der Probekörper zu mind. 75% nach 9 Monaten resorbiert und durch Knochen ersetzt. Diese Ergebnisse bestätigen die bereits bekannten osteokonduktiven Eigenschaften dieses Materials. Aufgrund dessen wurden die Implantate aus TCP als Versuchskontrolle eingesetzt. Die vorliegenden Resultate werden durch weitere Autoren bestätigt (Cavalcanti et al. 2008, Walsh et al. 2008, Mino-Farina et al. 2009), wobei Implantate aus TCP häufig in Versuchen in den Femur oder die Tibia von Kaninchen eingesetzt werden. Bei diesen Strukturen handelt es sich um Röhrenknochen, die eine höhere Knochenumbaurate als der Schädelknochen besitzen. Diese Einschränkung muss beim Vergleich der Ergebnisse berücksichtigt werden. Mino-Farina et al. wiesen von einem porösen TCP-Zement im Femur von Kaninchen nach 12 Wochen Implantation ein Restmaterial von ca. 30 % nach. Damit liegt die Resorptionsrate nach diesem Zeitraum wesentlich höher als bei der vorliegenden Promotionsarbeit. Nach 12 Wochen bzw. 3 Monaten wurden die TCP-Implantate in der der vorliegenden Promotionsarbeit zu 25% resorbiert. Auch Walsh et al. registrierten nach über 6 Monaten in der Tibia eine hohe Resorption von 90 - 100%. Im Vergleich dazu lag die Resorptionsrate innerhalb der vorliegenden Arbeit nach 6 Monaten bei ca. 75 %. Dabei kamen die genannten Autoren zu dem Schluss, dass die Porosität des TCPs der entscheidende Faktor für das osteokonduktive Einwachsen dieses Materials ist. Dennoch wiesen sie daraufhin, dass eine geringere

Resorption auch zu einer geringeren Knochenneubildung führen kann. Diese Problematik wurde innerhalb der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet, da das TCP in allen untersuchten Präparaten durch Knochen ersetzt wurde.

#### **6.2.3.2 Regressionsanalyse des BICs vom Schädeläußeren zum -inneren**

Es wurde eine univariable lineare Regression zur Untersuchung des Einflusses der Position entlang des Schädelknochens auf das Maß an direkten Knochen-Implantat-Kontakt (BIC) durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass der BIC unter Einbeziehung aller Daten vom Äußeren der Schädelkalotte zum Inneren signifikant abnimmt. Dies kann zum einen daran liegen, dass außen das Periost auf dem Knochen liegt und von diesem aus das Wachstum stattfindet und zum anderen, dass durch die Entnahme der Dura unterhalb des Trepanationsdefektes die Regenerationszone im Inneren fehlt. Bei der Dura und dem Periost handelt es sich um zwei Schichten mit hohem Regenerationspotential, welches allerdings mit zunehmendem Alter abnimmt. Dieser Sachverhalt wurde durch verschiedene Autoren beschrieben (Greenwald et al. 2000, Ascherman et al. 2001, Gosain et al. 2003). Greenwald et al. wiesen in Ratten nach, dass die kindlichen Durazellen mehr Wachstumsfaktoren produzieren als die erwachsenen Durazellen. Bei diesem Vergleich ist zu beachten, dass in der vorliegenden Arbeit Kaninchen als Versuchstiere eingesetzt wurden. Aschermann et al. und Gosain et. al. wiesen eine höhere Knochenbildung im Schädelknochen von jüngeren Kaninchen im Vergleich zu erwachsenen Tieren nach. Sie schlussfolgerten dementsprechend ein hohes Regenerationspotential der Durazellschicht, welches mit zunehmendem Alter abnimmt.

Die Besonderheit bei der vorliegenden Promotionsarbeit bestand darin, dass die Dura unter den Implantaten bei der Implantation gezielt entfernt wurde, um einen direkten Kontakt der Materialien mit dem Liquor zu gewährleisten und so mögliche toxische Reaktionen zu untersuchen. Aufgrund dessen fehlte die Regenerationsschicht an der Stelle des Bohrlochs im Inneren des Schädels, was ein geringeres Knochenwachstum im Vergleich zur Außenseite und somit den nach innen abnehmenden BIC hervorrufen könnte.

#### **6.2.3.3 BIC in den Hartgewebephistologien**

Die Zusammenfassung aller Zeiträume ergab für die Composit-Implantate mit der Polymerkomponente UM einen BIC von ca. 68% und für die Polymerkomponente UD einen BIC von ca. 56%. Dieser Unterschied war statistisch signifikant, jedoch bestanden relativ

hohe Schwankungen in den Werten des BICs zwischen den einzelnen Implantationsdauern der Materialien. Hierbei nahm der BIC bei den Compositen mit UM bis 6 Monate zu und nach 9 Monaten Implantationsdauer relativ stark ab. Hingegen stieg bei den Compositen mit UD-Monomer der BIC bis 9 Monate relativ konstant an. Beim Vergleich dieser Ergebnisse mit der Literatur zeigte sich, dass eine direkte Gegenüberstellung schwierig ist, da die getesteten Materialien in dieser Kombination selten genutzt werden und die Autoren sehr unterschiedliche Composite in ihren Versuchen evaluieren (Beruto et al. 2002, Fini et al. 2002, Bruens et al. 2003, Frihagen et al. 2007, Wang et al. 2007, Artzi et al. 2008, Bauer et al. 2009, Neumann 2009, Migliaresi 2012). Im Unterschied zu dieser Arbeit nutzten beispielsweise Beruto et al. und Fini et al. resorbierbare PMMA-TCP-Implantate. Die Implantate auf TCP-Basis dieses Versuchs wurden mit Methylmethacrylaten infiltriert. Normalerweise handelt es sich bei TCP um ein resorbierbares Material, wobei die Porenräume durch Infiltration mit den Monomeren verschlossen wurden und das Material durch diesen Vorgang nicht degradierbar war. Entsprechend der Fragestellung sollte ein stabiles Permanentimplantat für den Schädelknochen evaluiert werden, da die Knochenneubildungsrate v.a. im menschlichen Knochen relativ gering ist. Die Schwankungen in den Ergebnissen des BICs können unterschiedliche Gründe haben: die Versuchstiere reagieren individuell auf die OP, für jeden Zeitraum wurden neue Kaninchen eingesetzt, die optimierte Anzahl an Tieren und ausgewerteten Proben ist anfällig gegenüber Schwankungen und die Histologien zeigen nur einen kleinen Ausschnitt aus dem Verhältnis von Knochen und Implantat. Dennoch wurde nach der Interpretation der Ergebnisse das Polymer aus UD bevorzugt, da es in den Kaninchen den stabileren Verlauf des BICs über die gesamte Implantationsdauer zeigte. Ein Grund für diesen Unterschied zwischen den beiden Copolymeren UM und UD könnte die jeweilige Siedetemperatur dieser Komponenten sein. Dimethacrylate besitzen einen höheren Siedepunkt, wodurch es bei der Polymerisation zu einer geringeren Blasenbildung kommt. Dies bietet eine hohe technologische Sicherheit und gewährleistet eine höhere Stabilität im Vergleich zu den Monomethacrylaten.

Daneben zeigte sich beim Vergleich der im Rahmen dieser Promotionsarbeit verwendeten Composite ein höherer BIC bei den angefrästen Implantaten. Hierbei wird von einem zufälligen Einfluss ausgegangen, da die Implantate nur in einem kleinen Bereich angefräst wurden und dieser Bereich nicht in allen histologischen Schnitten mit abgebildet wurde. Dennoch kann es ein Hinweis auf einen möglichen Vorteil für das Anwachsen des Knochens sein, welcher in weiteren Experimenten getestet und spezifisch untersucht werden muss.

Da es sich um eine bisher kaum verwendete Composit-Zusammensetzung handelt, ist es sinnvoll die Resultate mit den häufiger verwendeten Knochenersatzmaterialien für die Schädelkalotte wie z.B. Titan oder Glaskeramiken zu vergleichen. Dabei sollte die Osseointegration der TCP-Composit-Implantate ähnlich gut und vergleichbar zu anderen alloplastischen Materialien sein. Da Rocha Barros et al. und Carmagnola et al. untersuchten den BIC von Glaskeramiken im Femur bzw. der Tibia von Kaninchen (da Rocha Barros et al. 2007, Carmagnola et al. 2008). Dabei erhoben da Rocha Barros et al. nach 12 Wochen einen BIC von 92 % und Carmagnola et al. nach 6 Wochen einen BIC von ca. 40 %. Beim Vergleich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit muss beachtet werden, dass die Knochenumbaurate dieser Röhrenknochen viel höher ist als in der Schädelkalotte. Daher ist auch der BIC in der Tibia und dem Femur nach wenigen Wochen Implantationsdauer im Vergleich zur Schädelkalotte verhältnismäßig höher. Dementsprechend wiesen die Implantate bei da Rocha Barros et al. nach 3 Monaten einen recht hohen BIC auf, was die Composit-Implantate aus UM nach ca. 6 Monaten im Vergleich mit 90 % nur knapp erreichten. Dennoch sind die Resultate der vorliegenden Promotionsarbeit unter Berücksichtigung der physiologischen Verhältnisse vergleichbar. Weiterhin muss auch beachtet werden, dass es viele verschiedene Glaskeramiken in unterschiedlicher Zusammensetzung gibt.

Neben diesen Materialien wird Titan häufig in die Tibia von Kaninchen implantiert und analysiert. So ermittelten Mora et al. und Gottlow et al. nach 4 Wochen Implantationsdauer einen BIC von ca. 60 % und Park et al. nach 3 Monaten einen BIC von ca. 63 % (Park et al. 2001, Gottlow et al. 2010, Morra et al. 2010). Die Composit-Implantate mit UM wiesen innerhalb der vorliegenden Promotionsarbeit nach 3 Monaten einen BIC von ca. 80 %, die Composit-Implantate mit UD dagegen wiesen nach dieser Zeit einen BIC von ca. 45 % auf. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Implantationsorte im Kaninchen sind die Ergebnisse der vorliegenden Promotionsarbeit mit denen der eben genannten Autoren vergleichbar. Folglich sind die evaluierten Composit-Implantate für den Einsatz im Schädelknochen geeignet und in dem Ausmaß an Osseointegration vergleichbar mit anderen Materialien.

#### **6.2.4 Vergleich von $\mu$ CT und Histologie**

Virtuelle Schnitte aus  $\mu$ CT-Datensätzen der Implantate wurden mit der Software „Histo-Gap“ auf den BIC (bone-implant-contact) untersucht und die Ergebnisse mit den Hartgewebephistologien desselben Implantats verglichen. Dabei zeigte sich, dass bei den



Hartgewebhistologien der gemessene Knochen-Implantat-Abstand an jeder Position entlang der Messstrecke des Schädelknochens um durchschnittlich 15  $\mu\text{m}$  geringer und der gemessene BIC damit höher war als bei den 3D-Schnitten.

Bezogen auf morphometrische Analysen von Knochen erhielten andere Autoren ähnliche Ergebnisse (Park et al. 2005, Stoppie et al. 2005, Stadler et al. 2006). Dabei führten beispielsweise Stoppie et al. die höhere Auflösung und die Einfachheit der Unterscheidung von Knochen und Implantat durch die Färbemethode in den Histologien als Begründung auf. Diese konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, da sich der Knochen und das Implantat durch die HE- und MG-Färbung deutlich voneinander unterschieden und die optische Auflösung und Detail-Erkennbarkeit bei den hier ausgewerteten Hartgewebhistologien im Vergleich zur  $\mu\text{CT}$  deutlich besser war. Vor allem im Bereich von direktem Knochen-Implantat-Kontakt bestand bei den  $\mu\text{CT}$ -Aufnahmen ein prinzipielles Unterscheidungsproblem aufgrund der sehr ähnlichen Grauwerte.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit lieferten bei Butz et al. die  $\mu\text{CT}$ -Aufnahmen in Ratten einen höheren BIC als die Hartgewebhistologien (Butz et al. 2006). Die Autoren führten hierbei z.B. die Qualität der Segmentierung und des Schleifvorganges der Histologien sowie Artefakte als Gründe für die Unterschiede zwischen den beiden Methoden auf. Die innerhalb dieser Arbeit angefertigten histologischen Präparate wurden nach der Trenn-Dünnschliff-Technik von Donath erstellt (Donath und Breuner 1982), die einen langjährige Erfahrung voraussetzt und einen hohen personellen sowie zeitlichen Aufwand bedeutet. Dadurch kann die Qualität der Hartgewebhistologien und Auflösung der Gewebe zwischen den einzelnen Laboren schwanken. Ebenso waren die eingesetzten Titan-Implantate in den  $\mu\text{CT}$ -Aufnahmen bei dieser Studie von Butz et al. eindeutig vom umliegenden Knochen unterscheidbar und die Auswertung dadurch erleichtert. Im Vergleich dazu ist die Unterscheidung der calciumphosphathaltigen Composit-Implantate und des Knochens in den 3D-Datensätzen der vorliegenden Arbeit sehr schwierig, was zu Ungenauigkeiten in den Resultaten führen kann.

Die erhobenen Ergebnisse zeigen, dass die beiden Methoden ergänzend zur Auswertung der Osseointegration eingesetzt werden sollten. Zu dieser Schlussfolgerung kamen weitere Autoren, da beide Methode individuelle Vor- und Nachteile besitzen (Hedberg et al. 2005, Thomsen et al. 2005, Yeom et al. 2008, Draenert et al. 2012). Dabei ist die  $\mu\text{CT}$  einerseits sehr gut für die räumliche Analyse von Knochenstrukturen geeignet, andererseits können die Gewebsstrukturen erhalten bleiben und alle Informationen genutzt werden. Dennoch ist die Analyse von Weichgeweben mit dieser Technik bisher recht eingeschränkt. Für diesen Zweck

müssen histologische Präparate angefertigt werden, in denen alle Strukturen und Zellen betrachtet werden können. Hierbei wird die Zerstörung der Proben und der Verlust von Informationen in Kauf genommen (Park et al. 2005, Thomsen et al. 2005, Stadler et al. 2006, Yeom et al. 2008, Cha et al. 2009, Efeoglu et al. 2009, Draenert et al. 2012).

### **6.3 Diskussion der statistischen Methode**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die statistische Auswertung des BICs der Hartgewebehistologien und 3D-Datensätze das Modell der „Verallgemeinerten Schätzungsgleichungen“ (GEE, Generalized Estimating Equations) verwendet. Dieses Modell dient zur Auswertung von Längsschnittdaten, innerhalb derer zu einem Objekt (hier einem Tier) mehrere Beobachtungen (hier histologische Schnitte) durchgeführt und unterschiedliche Versuchsebenen betrachtet werden (Burton et al. 1998). In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde das Modell eingesetzt, da es die statistische Auswertung inhomogener und nicht normalverteilter Daten erlaubt (Ziegler et al. 1998, Ziegler und Vens 2010). Für jedes Tier stand eine unterschiedliche Anzahl an Präparaten zur Verfügung, wobei es zu einer linksschiefen Verteilung der Daten kam. Aufgrund dieses Vorteils wird das Modell der „Verallgemeinerten Schätzungsgleichungen“ von anderen Autoren zur Auswertung unterschiedlicher Daten eingesetzt (Zorn 2001, Keller 2003, Ziegler und Vens 2010, Nagashima et al., Anker et al. 2013). Beispielweise untersuchte Zorn die zufälligen Effekte von politischen Wahlen und die unterschiedliche Beteiligung der Mitglieder. Keller analysierte in seiner Studie die Entwicklung von Depressionen. Während dieser Untersuchung gingen Informationen durch das Verlassen von Patienten oder durch das Nichterheben von Daten verloren. Daher kam es zu nicht normalverteilten und inhomogenen Daten sowie zu einer eingeschränkten Teststärke, weshalb der Autor das GEE zur statistischen Auswertung der Ergebnisse nutzte. Dieses Problem ergab sich auch bei der vorliegenden Promotionsarbeit, in welcher für jedes Tier eine unterschiedliche Anzahl an histologischen Präparaten und damit erhobenen Messwerten zur Verfügung stand. Aufgrund dessen hätten bei der Anwendung einer linearen Varianzanalyse viele Schnitte ausgeschlossen werden müssen, was die Datenmenge bei den wenigen Versuchstieren zusätzlich verringert hätte. Mit dem GEE konnten alle zur Verfügung stehenden Messergebnisse valide ausgewertet werden, da es für jedes Tier mehrere Messungen (Beobachtungen) gab und diese einzelnen Messungen in dem Modell miteinander korreliert werden (Burton et al. 1998). Dieses statistische Modell bietet nicht nur Vorteile, sondern ist mit verschiedenen Schwierigkeiten verbunden. Adamis et al.

und Nagashima et al. kamen zu dem Fazit, dass es eine sehr komplexe Auswertungsmethode mit hohem Zeitaufwand ist (Adamis 2009, Nagashima et al. 2012). Der hohe zeitliche und technische Aufwand konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Daneben wird dieses Modell selten zur Auswertung von Daten im Schädelbereich verwendet, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit den Resultaten anderer Autoren einschränkt.

Im Gegensatz zu diesem statistischen Modell verwendeten andere Autoren gemischte lineare Modelle, da deren Daten normalverteilt waren (Bernhardt et al. 2005, Kuemmerle et al. 2005, Cavalcanti et al. 2008, Xu et al. 2008, Lin et al. 2009). Beispielsweise werteten Bernhardt et al. die Ergebnisse von Synchrotron-Aufnahmen und Histologien mit dem ANOVA-Test aus. Dabei untersuchten sie jeweils immer 3 Schnitte pro Implantat und Zeitraum nach 5 und 12 Wochen Implantationsdauer. Aufgrund dessen stand eine homogene und normalverteilte Datengrundlage zur Verfügung, was die Anwendung eines linearen Modells ermöglichte. Im Falle der vorliegenden Arbeit existierte für jedes Tier aufgrund der unterschiedlichen Qualität der Histologien eine unterschiedliche Anzahl an histologischen Schnitten. Dadurch konnten einfache gemischte Modelle hierbei nicht angewendet werden, da diese Tests im Gegensatz zum GEE immer eine Gleichheit zwischen den Daten über die Zeiträume hinweg annehmen (Keller 2003). Dadurch wäre es im Falle der vorliegenden Promotionsarbeit zur Über- oder Unterschätzung des BICs für jedes Tier gekommen. Daher ist das GEE das geeignete Modell für die statistische Auswertung der vorliegenden Daten und ermöglicht somit auch bei einer geringen Anzahl an Versuchstieren eine valide statistische Analyse.

## 7 Schlussfolgerungen

Die erhobenen Ergebnisse zeigen, dass die neuen TCP-Polymer-Composit-Implantate biokompatibel, stabil und für den Einsatz im Schädelknochen geeignet sind. Dabei weisen die Implantate mit der Komponente Dimethacrylat (UD) ein geringfügig besseres Einwachsverhalten auf, weshalb dieses Polymer in weiterführenden Versuchen eingesetzt wird. Der Knochen-Implantat-Kontakt (bone-implant-contact, BIC) ist ein zuverlässiger Parameter zur Beurteilung der Osseointegration. Die neuentwickelte Morphometrie-Software „Histo-Gap“ ermöglicht eine effiziente, ergonomische und statistische Auswertung des BICs der histologischen Präparate. Da mit dieser Software nicht alle Parameter für die Beurteilung der Osseointegration und Biokompatibilität erhoben werden können, müssen objektivierbare Scores für den Resorptionsgrad des Tricalciumphosphats (TCP) und der Erhebung der Entzündungs- und Fremdkörperreaktion genutzt werden. Die  $\mu$ CT und die Histologie sind für die Beurteilung der Osseointegration und Biokompatibilität der Implantatmaterialien geeignet. Dabei ist die  $\mu$ CT eher für die räumliche Analyse von Knochenstrukturen und röntgendichter Materialien sowie zur Beurteilung des Knochen-Implantat-Kontakts geeignet. Die Darstellung von Weichgeweben, Entzündungszellen und weniger röntgendichter Objekte ist mit dieser Methode nicht möglich. Daneben ist die semiautomatische Segmentierung von Materialien mit ähnlicher Röntgendichte wie z.B. dem calciumphosphathaltigen Implantaten und dem Knochen schwierig, weshalb die semiautomatische Segmentierung für diesen Versuch keine geeignete Auswertungsmethode darstellte. In diesem Fall kann ein texturbasierter Algorithmus zur Trennung des Knochens und Implantats in den 3D-Datensätzen eine Lösung darstellen. Im Gegensatz dazu ist die Histologie zur Darstellung aller Knochenersatzmaterialien und Gewebe geeignet, wobei diese Methode mit einem Informationsverlust durch nicht vermeidbare Abstände zwischen den einzelnen Schlifften sowie der Zerstörung der Probe einhergeht. Aufgrund der spezifischen Vor- und Nachteile der  $\mu$ CT und Histologie sollten diese beiden Methoden kombiniert und zur Auswertung der Osseointegration und Biokompatibilität verwendet werden. Dadurch können bei einer optimierten Anzahl an Versuchstieren möglichst viele Informationen gewonnen werden. Das Modell der „Verallgemeinerten Schätzungsgleichungen“ (Generalized Estimating Equations, GEE) ist zur statistischen Auswertung der vorliegenden inhomogen verteilten Daten geeignet, da durch dieses Modell alle vorhandenen Ergebnisse ohne Informationsverlust in die statistische Analyse einbezogen werden können. Es ermöglicht somit auch bei einer optimierten Anzahl an Versuchstieren eine valide statistische Analyse.

## 8      **Literatur- und Quellenverzeichnis**

- Adamis D. 2009. Statistical methods for analysing longitudinal data in delirium studies. *International Review of Psychiatry*, 21 (1):74-85.
- Al-Nawas B, Grotz KA, Goetz H, Feil M, Duschner H, Wagner W. 2006. Systematic qualitative histology of enossal implants with anodically oxidised surfaces. *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie*, 10 (4):229-237.
- Alberius P, Isaksson S, Klinge B, Sjogren S, Jonsson J. 1990. Regeneration of cranial suture and bone plate lesions in rabbits - implications for positioning of osteotomies. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 18 (6):271-279.
- Alt V, Bitschnau A, Bohner F, Heerich KE, Magesin E, Sewing A, Pavlidis T, Szalay G, Heiss C, Thormann U, Hartmann S, Pabst W, Wenisch S, Schnettler R. 2011. Effects of gentamicin and gentamicin-RGD coatings on bone ingrowth and biocompatibility of cementless joint prostheses: An experimental study in rabbits. *Acta Biomaterialia*, 7 (3):1274-1280.
- Anderson JM. 2011. Biocompatibility and Bioresponse to Biomaterials. In: Atala A, Lanza R, Thomson JA, Nerem R, Hrsg. *Principles of Regenerative Medicine* San Diego: Academic Press, 693-716.
- Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. 2008. Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in Immunology*, 20 (2):86-100.
- Anker CJ, O'Donnell K, Boucher KM, Gaffney DK. 2013. Effect of brachytherapy technique and patient characteristics on cervical cancer implant dosimetry. *Medical Dosimetry*, (0).
- Artzi Z, Kozlovsky A, Nemcovsky CE, Moses O, Tal H, Rohrer MD, Prasad HS, Weinreb M. 2008. Histomorphometric Evaluation of Natural Mineral Combined with a Synthetic Cell-binding Peptide (P-15) in Critical-size Defects in the Rat Calvaria. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 23 (6):1063-1070.

- Ascherman J, Knowles S, Marin V, Prisant N, Hu G, Chiu DT. 2001. Cranial reossification with absorbable plates. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 107 (3):763-768.
- Bankman IN, Hrsg. 2009. *Handbook of Medical Image Processing and Analysis*. 2nd. San Diego, London: Elsevier.
- Batniji RK, Hutchison JL, Dahiya R, Lam SL, Williams EF, 3rd. 2002. Tissue response to expanded polytetrafluoroethylene and silicone implants in a rabbit model. *Facial Plastic Surgery*, 4 (2):111-113.
- Bauer N, Brinke N, Heiss C, Skoripa A, Peters F, Kraus R, Schnettler B, Moritz A. 2009. Biodegradable beta-Tri-Calciumphosphate/hydroxyethyl methacrylate enhanced three component bone adhesive demonstrates biocompatibility without evidence of systemic toxicity in a rabbit model. *J Biomed Mater Res B: Applied Biomaterials*, 90B (2):767-777.
- Beleites E, Schneider G, Fried W, Schumann D, Linss W. 2001. 3-D-Referenzimplantate für den Gesichts- und Hirnschädel. *Deutsches Ärzteblatt*, 98 (5):244-248.
- Bernhardt R, van den Dolder J, Bierbaum S, Beutner R, Scharnweber D, Jansen J, Beckmann F, Worch H. 2005. Osteoconductive modifications of Ti-implants in a goat defect model: characterization of bone growth with SR mu CT and histology. *Biomaterials*, 26 (16):3009-3019.
- Beruto DT, Botter R, Fini M. 2002. The effect of water in inorganic microsponges of calcium phosphates on the porosity and permeability of composites made with polymethylmethacrylate. *Biomaterials*, 23 (12):2509-2517.
- Bitschnau A, Alt V, Böhner F, Heerich KE, Margesin E, Hartmann S, Sewing A, Meyer C, Wenisch S, Schnettler R. 2009. Comparison of New Bone Formation, Implant Integration, and Biocompatibility Between RGD-Hydroxyapatite and Pure Hydroxyapatite Coating for Cementless Joint Prostheses-An Experimental Study in Rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*, 88B (1):66-74.

- Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Muller R. 2010. Guidelines for Assessment of Bone Microstructure in Rodents Using Micro-Computed Tomography. *Journal of Bone and Mineral Research*, 25 (7):1468-1486.
- Brandt J, Henning S, Michler G, Hein W, Bernstein A, Schulz M. 2010. Nanocrystalline hydroxyapatite for bone repair: an animal study. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, 21 (1):283-294.
- Branemark R, Branemark PI, Rydevik B, Myers RR. 2001. Osseointegration in skeletal reconstruction and rehabilitation: A review. *Journal of Rehabilitation Research and Development*, 38 (2):175-181.
- Breusch SJ, Kuhn KD. 2003. Bone cements based on polymethylmethacrylate. *Orthopäde*, 32 (1):41-50.
- Briem D, Strametz S, Schröder K, Meenen M, Lehmann W, Linhart W, Ohl A, Rueger JM. 2005. Response of primary fibroblasts and osteoblasts to plasma treated polyetheretherketone (PEEK) surfaces. *Journal of Material Science*, 16:671-677.
- Bruens ML, Pieterman H, Wijn de JR, Vanndrager JM. 2003. Porous Polymethylmethacrylate as Bone Substitute in the Craniofacial Area. *Journal of Craniofacial Surgery*, 14 (1):63-68.
- Brunke O. 2008. Mit nanoCT verborgene Mikrostrukturen dreidimensional analysieren. *Conference on Industrial Computed Tomography*. Shaker Verlag GmbH, 65-70.
- Burton P, Gurrin L, Sly P. 1998. Tutorial in Biostatistics: Extending the simple linear regression model to account for correlated responses: an introduction to generalized estimating equations and multi-level mixed modelling. *Statistics in Medicine*, 17:1261-1291.
- Busenlechner D, Tangl S, Mair B, Fugger G, Gruber R, Redl H, Watzek G. 2008. Simultaneous in vivo comparison of bone substitutes in a guided bone regeneration model. *Biomaterials*, 29 (22):3195-3200.

- Butz F, Ogawa T, Chang TL, Nishimura I. 2006. Three-dimensional bone-implant integration profiling using micro-computed tomography. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 21 (5):687-695.
- Carmagnola D, Abati S, Celestino S, Chiapasco M, Bosshardt D, Lang NP. 2008. Oral implants placed in bone defects treated with Bio-Oss®, Ostim®-Paste or PerioGlas: an experimental study in the rabbit tibiae. *Clinical Oral Implants Research*, 19 (12):1246-1253.
- Cavalcanti S, Pereira CL, Mazzonetto R, de Moraes M, Moreira RWF. 2008. Histological and histomorphometric analyses of calcium phosphate cement in rabbit calvaria. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 36 (6):354-359.
- Cha JY, Lim JK, Song JW, Sato D, Kenmotsu M, Inoue T, Park YC. 2009. Influence of the Length of the Loading Period After Placement of Orthodontic Mini-implants on Changes in Bone Histomorphology: Microcomputed Tomographic and Histologic Analysis. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 24 (5):842-849.
- Chappard D, Retaillieu-Gaborit N, Legrand E, Basle MF, Audran M. 2005. Comparison insight bone measurements by histomorphometry and  $\mu$ -CT. *Journal of Bone and Mineral Research*, 20 (7):1177-1184.
- Chopra PM, Johnson M, Nagy TR, Lemons JE. 2009. Clinical Device-Related Article Micro-Computed Tomographic Analysis of Bone Healing Subsequent to Graft Placement. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*, 88B (2):611-618.
- Clark N. 2002. Fluorochrome labeled bone (part II): Results from various slide preparation techniques and microscopic filters. *Journal of Histotechnology*, 25 (2):105-107.
- Clokier CML, Moghadam H, Jackson MT, Sandor GKB. 2002. Closure of Critical Sized Defects With Allogenic and Alloplastic Bone Substitutes. *Journal of Craniofacial Surgery*, 13 (1):111-121.



- Costantino PD, Hiltzik D, Satish G. 2002. Bone Healing and Bone Substitutes. *Facial Plastic Surgery*, 18 (1):13-26.
- da Rocha Barros VM, Liporaci JLJ, Rosa AL, Junqueira MC, de Oliveira PT, Johnson A, van Noort R. 2007. Bone response to three different chemical compositions of fluorcanasite glass-ceramic. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 83A (2):480-483.
- de Freitas Costa NM, Melo BR, Brito RT, de Oliveira Fernandes GV, Bernardo VG, Fonseca EC, Conz MB, Soares GA, Granjeiro JM. 2009. Quality and intensity of the tissue response to two synthetic granular hydroxyapatite implanted in critical defects of rat calvaria. *Journal of Material Research*, 12 (2):245-251.
- Donath K, Breuner G. 1982. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft-tissues- The Säge-Schliff (sawing and grinding) Technique. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 11 (4):318-326.
- Draenert ME, Draenert AI, Forriol F, Erler M, Kunzelmann KH, Hickel R, Draenert K. 2012. Value and limits of  $\mu$ -CT for nondemineralized bone tissue processing. *Microscopy Research and Technique*, 75 (4):416-424.
- Efeoglu C, Burke JL, Parsons AJ, Aitchison GA, Scotchford C, Rudd C, Vikram A, Fisher SE. 2009. Analysis of calvarial bone defects in rats using microcomputed tomography: potential for a novel composite material and a new quantitative measurement. *British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*, 47 (8):616-621.
- Egger J, Kapur T, Nimsky C, Kikinis R. 2012. Pituitary Adenoma Volumetry with 3D Slicer. *PLoS ONE*, 7 (12):e51788.
- Endres S, Wilke M, Frank H, Knoll P, Kratz M, Windler M, Wilke A. 2005. Histomorphometric evaluation of bone ingrowth of porous titanium by a computer-assisted analyzing system. *Biomedizinische Technik*, 50 (12):408-412.

- Eppley BL. 2003. Alloplastic cranioplasty. *Operative Techniques in Plastic and Reconstructive Surgery*, 9 (1):16-22.
- Faraj KA, Cuijpers V, Wismans RG, Walboomers XF, Jansen JA, van Kuppevelt TH, Daamen WF. 2009. Micro-Computed Tomographical Imaging of Soft Biological Materials Using Contrast Techniques. *Tissue Engineering Part C-Methods*, 15 (3):493-499.
- Feldkamp LA, Davis LC, Kress JW. 1984. Practical cone-beam algorithm. *Journal of the Optical Society of America a-Optics Image Science and Vision*, 1 (6):612-619.
- Findikcioglu K, Finclikcioglu F, Yavuzer R, Elmas C, Atabay K. 2009. Effect of Platelet-Rich Plasma and Fibrin Glue on Healing of Critical-Size Calvarial Bone Defects. *Journal of Craniofacial Surgery*, 20 (1):34-40.
- Fini M, Giavaresi G, Aldini NN, Torricelli P, Botter R, Beruto D, Giardino R. 2002. A bone substitute composed of polymethylmethacrylate and alpha-tricalcium phosphate: results in terms of osteoblast function and bone tissue formation. *Biomaterials*, 23 (23):4523-4531.
- Fisher JP, Vehof JWM, Dean D, van der Waerden JPCM, Holland TA, Mikos AG, Jansen JA. 2002. Soft and hard tissue response to photocrosslinked poly(propylene fumarate) scaffolds in a rabbit model. *Journal of Biomedical Materials Research*, 59 (3):547-556.
- Flecknell P. 2002. Replacement, reduction and refinement. *Altex*, 19 (2):73-78.
- Follet H, Bruyère-Garnier K, Peyrin F, Roux JP, Arlot ME, Burt-Pichat B, Rumelhart C, Meunier PJ. 2005. Relationship between compressive properties of human os calcis cancellous bone and microarchitecture assessed from 2D and 3D synchrotron microtomography. *Bone*, 36 (2):340-351.
- Frihagen F, Madsen JE, Reinholt FP, Nordsletten L. 2007. Screw augmentation in displaced femoral neck fractures: Clinical and histological results using a new composite. *Injury*, 38 (7):797-805.

- Gaggl A, Schultes G, Rainer H, Karcher H. 2000. Histological and histomorphometric results of implantation of dental implants by early and late implantation. *Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie*, 4 (5):278-284.
- Gladstone HB, McDermott MW, Cooke DD. 1995. Implants for cranioplasty. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 28 (2):381-400.
- Goiato MC, Anchieta RB, Pita MS, dos Santos DM. 2009. Reconstruction of Skull Defects: Currently Available Materials. *Journal of Craniofacial Surgery*, 20 (5):1512-1518.
- Goodman SB, Fornasier VL, Keil J. 1991. Quantitative comparison of the histological effects of particulate polymethylmethacrylate versus polyethylene in the rabbit tibia. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, 110 (3):123-126.
- Gosain AK, Santoro TD, Song LS, Capel CC, Sudhakar PV, Madoub HS. 2003. Osteogenesis in calvarial defects: Contribution of the dura, the pericranium, and the surrounding bone in adult versus infant animals. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 112 (2):515-527.
- Gottlow J, Sennerby L, A. R, Flynn M. 2010. An Experimental Evaluation of a New Craniofacial Implant Using the Rabbit Tibia Model: Part I. Histologic Findings. *Otology & Neurotology*, 31:832-839.
- Greenwald JA, Mehrara BJ, Spector JA, Chin GS, Steinbrech DS, Saadeh PB, Luchs JS, Paccione MF, Gittes GK, Longaker MT. 2000. Biomolecular mechanisms of calvarial bone induction: Immature versus mature dura mater. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 105 (4):1382-1392.
- Greiner-Petter C. 2012. Programmierung der Softwaremodule Ilmenau: Greiner-Petter.
- Grossterlinden L, Janssen A, Schmitz N, Priemel M, Pogoda P, Amling M, Rueger JM, Linhart W. 2006. Deleterious tissue reaction to an alkylene bis(dilactoyl)-methacrylate bone adhesive in long-term follow up after screw augmentation in an ovine model. *Biomaterials*, 27 (18):3379-3386.

- Hallab N, Bao Q-B, Brown T. 2013. Assessment of epidural versus intradiscal biocompatibility of PEEK implant debris: an in vivo rabbit model. *European Spine Journal*:1-12.
- Hanasono MM, Goel N, DeMonte F. 2009. Calvarial Reconstruction With Polyetheretherketone Implants. *Annals of Plastic Surgery*, 62 (6):653-655.
- Handels H. 2009a. Medizinische Bildverarbeitung. Viewg und Teubner, 2. Auflage:95-165.
- Handels H. 2009b. Grundlagen Diagnose- und Therapieunterstützender Bildverarbeitungssysteme. In: Handels H, Hrsg. Medizinische Bildverarbeitung. 2. Aufl. Wiesbaden: Vieweg+Teubner, 49-69.
- Handels H. 2009c. Segmentierung medizinischer Bilddaten. In: Handels H, Hrsg. Medizinische Bildverarbeitung. 2. Aufl. Wiesbaden: Vieweg+Teubner, 95-156.
- Handels H, Ehrhardt J, Deserno T, Meinzer H-P, Tolxdorff T, Hrsg. 2011. Bildverarbeitung für die Medizin 2011. Algorithmen - Systeme - Anwendungen ; Proceedings des Workshops vom 20. bis 22. März 2011 in Lübeck. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Heath DG, Hahn HK, Johnson PT, Fishman EK. 2008. Automated Multidetector Row CT Dataset Segmentation with an Interactive Watershed Transform (IWT) Algorithm: Part 1. Understanding the IWT Technique. *Journal of Digital Imaging*, 21 (4):408-412.
- Hedberg EL, Kroese-Deutman HC, Shih CK, Lemoine JJ, Liebschner MAK, Miller MJ, Yasko AW, Crowther RS, Carney DH, Mikos AG, Jansen JA. 2005. Methods: A comparative analysis of radiography, microcomputed tomography, and histology for bone tissue engineering. *Tissue Engineering*, 11 (9-10):1356-1367.
- Hench LL. 2006. The story of Bioglass. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, 17 (11):967-978.
- Hollinger JO, Kleinschmidt JC. 1990. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *Journal of Craniofacial Surgery*, 1 (1):60-68.

- Holmes AM, Creton S, Chapman K. 2010. Working in partnership to advance the 3Rs in toxicity testing. *Toxicology*, 267:14-19.
- Isaksson S, Alberius P, Klinge B. 1993. Influence of 3 alloplastic materials on calvarial bone healing - an experimental evaluation of HTR(R)-polymer, lactomer beads, and a carrier gel. *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*, 22 (6):375-381.
- Jähne B. 2012. *Digitale Bildverarbeitung und Bildgebung*. Springer Verlag, 7. Auflage:541-554.
- Keller F. 2003. Analyse von Längsschnittdaten. *Zeitschrift für Klinische Psychologie und Psychotherapie*, 32 (1):51-61.
- Khoury J, Kirkpatrick SR, Maxwell M, Cherian RE, Kirkpatrick A, Svrluga RC. 2012. Neutral atom beam technique enhances bioactivity of PEEK. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*.
- Kiba H, Hayakawa T, Oba S, Kuwabara M, Habata I, Yamamoto H. 2003. Potential application of high-resolution microfocus X-ray techniques for observation of bone structure and bone-implant interface. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 18 (2):279-285.
- Kirkpatrick CJ, Krump-Konvalinkova V, Unger RE, Bittinger F, Otto M, Peters K. 2002. Tissue response and biomaterial integration: the efficacy of in vitro methods. *Biomolecular Engineering*, 19:211-217.
- Kriegel RJ, C. S, H. C. 2007. Cranioplasty for Large Skull Defects with PMMA or Tutoplast (R) Processed Autogenic Bone Grafts. *Central European Neurosurgery*, 68:182-189.
- Kuemmerle JM, Oberle A, Oechslin C, Böhner M, Frei C, Boeckel I, Reichenberg Bv. 2005. Assessment of the suitability of a new brushite calcium phosphate cement for cranioplasty - an experimental study in sheep. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 33 (1):37-44.

- Kulak CAM, Dempster DW. 2010. Bone histomorphometry: a concise review for endocrinologists and clinicians. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 54:87-98.
- Lange T, Schilling AF, Peters F, Haag F, Morlock MM, Rueger JM, Amling M. 2009. Proinflammatory and osteoclastogenic effects of beta-tricalciumphosphate and hydroxyapatite particles on human mononuclear cells in vitro. *Biomaterials*, 30 (29):5312-5318.
- Larsen R, Nielsen M, Sporning J, Petersson J, Brismar T, Smedby År. 2006. Analysis of Skeletal Microstructure with Clinical Multislice CT. *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention Springer Berlin Heidelberg*, 880-887.
- Liebschner MAK. 2004. Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. *Biomaterials*, 25 (9):1697-1714.
- Lin AY, Kinsella CR, Jr., Rottgers SA, Smith DM, Grunwaldt LJ, Cooper GM, Losee JE. 2012. Custom Porous Polyethylene Implants for Large-scale Pediatric Skull Reconstruction: Early Outcomes. *Journal of Craniofacial Surgery*, 23 (1):67-70.
- Lin L, Shen Q, Wei XL, Hou Y, Xue T, Fu X, Duan XN, Yu CL. 2009. Comparison of Osteogenic Potentials of BMP4 Transduced Stem Cells from Autologous Bone Marrow and Fat Tissue in a Rabbit Model of Calvarial Defects. *Calcified Tissue International*, 85 (1):55-65.
- Linde, D. Microcomposite-Implantate für den Knochenersatz im Schädelbereich: Charakterisierung von Materialeigenschaften durch Nano-Indentation Jahrestagung 2010 der DGBM. Heiligenstadt.
- Lippert H. 2011. *Lehrbuch Anatomie*. Elsevier, Urban und Fischer Verlag München, 8. Auflage.

- Liu JK, Gottfried ON, Cole CD, Dougherty WR, Couldwell WT. 2004. Porous polyethylene implant for cranioplasty and skull base reconstruction. *Neurosurgical Focus*, 16 (3):1-5.
- Maier W. 2009. Biomaterials in Reconstructive Skull Base Surgery. *Laryngo-Rhino-Otologie*, 88 (s 01):64-75.
- Marechal M, Luyten F, Nijs J, Postnov A, Schepers E, van Steenberghe D. 2005. Histomorphometry and micro-computed tomography of bone augmentation under a titanium membrane. *Clinical Oral Implants Research*, 16 (6):708-714.
- Martini L, Staffa G, Giavaresi G, Salamanna F, Parrilli A, Serchi E, Pressato D, Arcangeli E, Fini M. 2011. Long-Term Results following Cranial Hydroxyapatite Prosthesis Implantation in a Large Skull Defect Model. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 129 (4):625-635.
- Migliaresi C. 2012. Composites. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE, Hrsg. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine* Amsterdam: Academic Press / Elsevier, 223-241.
- Min S, Sato S, Saito M, Ebihara H, Arai Y, Ito K. 2008. Micro-computerized tomography analysis: dynamics of bone augmentation within a titanium cap in rabbit calvarium. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 106 (6):892-895.
- Ming-Yih L, Chong-Ching C, Chao-Chun L, Lun-Jou L, Yu-Ray C. 2002. Custom implant design for patients with cranial defects. *Engineering in Medicine and Biology Magazine, IEEE*, 21 (2):38-44.
- Mino-Farina N, Munoz-Guzon F, Lopez-Pena M, Ginebra MP, del Valle-Fresno S, Ayala D, Gonzalez-Cantalapiedra A. 2009. Quantitative analysis of the resorption and osteoconduction of a macroporous calcium phosphate bone cement for the repair of a critical size defect in the femoral condyle. *Veterinary Journal*, 179 (2):264-272.

- Moreira-Gonzalez A, Loboeki C, Barakat K, Andrus L, Bradford M, Gilsdorf M, Jackson IT. 2005. Evaluation of 45S5 Bioactive Glass Combined as a Bone Substitute in the Reconstruction of Critical Size Calvarial Defects in Rabbits. *Journal of Craniofacial Surgery*, 16 (1):63-70.
- Morra M, Cassinelli C, Cascardo G, Bollati D, Baena RRY. 2010. Multifunctional implant surfaces: Surface characterization and bone response to acid-etched Ti implants surface-modified by fibrillar collagen *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 94A (1):271-279.
- Muthu Rama Krishnan M, Choudhary A, Chakraborty C, Ray AK, Paul RR. 2011. Texture based segmentation of epithelial layer from oral histological images. *Micron*, 42 (6):632-641.
- Nagashima K, Sato Y, Noma H, Hamada C. 2012. An efficient and robust method for analyzing population pharmacokinetic data in genome-wide pharmacogenomic studies: a generalized estimating equation approach. *Statistics in Medicine*.
- Neumann A. 2009. Biomaterials for Craniofacial Reconstruction. *Laryngo-Rhino-Otologie*, 88 (01):48-63.
- Neuser E, Sommerfeld D. nanotom<sup>®</sup> Computertomographie mit Submikrometernaflösung. *DGZfP- Jahrestagung 2007*, 12.
- Offer L, Veigel B, Pavlidis T, Heiss C, Gelinsky M, Reinstorf A, Wenisch S, Lips KS, Schnettler R. 2011. Phosphoserine-modified calcium phosphate cements: bioresorption and substitution. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 5 (1):11-19.
- Orsini E, Salgarello S, Bubalo M, Lazic Z, Trire A, Martini D, Franchi M, Ruggeri A. 2009. Histomorphometric evaluation of implant design as a key factor in peri-implant bone response: a preliminary study in a dog model. *Minerva Stomatol*, 58 (6):263-275.



- Osborn JF. 1985. Implantatwerkstoff Hydroxylapatitkeramik. Grundlagen und klinische Anwendung. Berlin, Chicago, London, Rio de Janeiro, Tokio: Quintessenz Verlags-GmbH.
- Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR. 1987. Bone Histomorphometrie - Standardization of Nomenclature, Symbols and Units. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2 (6):595-610.
- Park HK, Dujovny M, Agner C, Diaz FG. 2001. Biomechanical properties of calvarium prosthesis. *Neurological Research*, 23 (2-3):267-276.
- Park YS, Yi KY, Lee IS, Jung YC. 2005. Correlation between microtomography and histomorphometry for assessment of implant osseointegration. *Clinical Oral Implants Research* 16 (2):156-160.
- Parker J, Walboomers XF, Von den Hoff JW, Maltha JC, Jansen JA. 2002. The effect of bone anchoring and micro-grooves on the soft tissue reaction to implants. *Biomaterials*, 23 (18):3887-3896.
- Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. 2007. Animal models for implant biomaterial research in bone: A review. *European Cells & Materials*, 13:1-10.
- Peter Z, Bousson V, Bergot C, Peyrin F. 2008. A constrained region growing approach based on watershed for the segmentation of low contrast structures in bone micro-CT images. *Pattern Recognition*, 41 (7):2358-2368.
- Peyrin F. 2011. Evaluation of bone scaffolds by micro-CT. *Osteoporosis International*, 22 (6):2043-2048.
- Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, Aldini NN, Fini M, Parrilli A, Dozza B, Donati D, Marchetti C. 2010. Dose-dependent effect of adipose-derived adult stem cells on vertical bone regeneration in rabbit calvarium. *Biomaterials*, 31 (13):3527-3535.

- Rechtenbach A, Grimm G, Vogt S, Schnabelrauch M, Khalyfa A, Meyer W. 2009. Herstellung von keramischen Knochenersatzmaterialien mittels eines 3D-Druckverfahrens. Bern: Competence Center for Medical Technology, Stauffacherstrasse 78, 3014 Bern.
- Ren PG, Lee SW, Biswal S, Goodman SB. 2008. Systemic trafficking of macrophages induced by bone cement particles in nude mice. *Biomaterials*, 29 (36):4760-4765.
- Ritman EL. 2011. Current status of developments and applications of micro-CT. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 13:531-552.
- Rivard C-H, Rhalmi S, Coillard C. 2002. In vivo biocompatibility testing of peek polymer for a spinal implant system: A study in rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research*, 62 (4):488-498.
- Rohde S 2013. 19.04.2013. Der Tutoplast-Prozess - Weltweit einzigartig
- Roy TD, Simon JL, Ricci JL, Rekow ED, Thompson VP, Parsons JR. 2003. Performance of hydroxyapatite bone repair scaffolds created via three-dimensional fabrication techniques. *Journal of Biomedical Materials Research*, 67A (4):1228-1237.
- Santos OJd, Marques GdS, Sauaia Filho EN, Frota GM, Santos RHP, Santos RAP. 2012. Use of 2-octyl cyanoacrylate adhesive in rat liver induced lesion. *Acta Cirurgica Brasileira*, 27:624-629.
- Schambach SJ, Bag S, Schilling L, Groden C, Brockmann MA. 2010. Application of micro-CT in small animal imaging. *Methods*, 50 (1):2-13.
- Schliephake H, Scharnweber D. 2008. Chemical and biological functionalization of titanium for dental implants. *Journal of Materials Chemistry*, 18 (21):2404-2414.
- Schneider G. 2003. Bioimplantate - Eigenschaften und Anwendungshinweise. *Laryngo-Rhino-Otologie*, 82 (12):839-852.

- Schneider G, Blechschmidt K, Linde D, Litschko P, Körbs T, Beleites E. 2010. Bone regeneration with glass ceramic implants and calcium phosphate cements in a rabbit cranial defect model. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, 21 (10):2853-2859.
- Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K. 2006. *Prometheus Kopf und Neuroanatomie*. Thieme Verlag, 1. Auflage:9.
- Sethuraman S, Nair LS, El-Amin S, Farrar R, Nguyen M-TN, Singh A, Allcock HR, Greish YE, Brown PW, Laurencin CT. 2006. In vivo biodegradability and biocompatibility evaluation of novel alanine ester based polyphosphazenes in a rat model. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 77A (4):679-687.
- Shand JM, Heggie AAC, Holmes AD, Holmes W. 2002. Allogeneic bone grafting of calvarial defects: an experimental study in the rabbit. *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*, 31 (5):525-531.
- Simon JL, Michna S, Lewis JA, Rekow ED, Thompson VP, Smay JE, Yampolsky A, Parsons JR, Ricci JL. 2007. In vivo bone response to 3D periodic hydroxyapatite scaffolds assembled by direct ink writing. *Journal of Biomedical Materials Research*, 83 (3):747-758.
- Spetzger U, Vougioukas V, Schipper J. 2010. Materials and techniques for osseous skull reconstruction. *Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies*, 19 (2):110-121.
- Stadler JA, Cortes W, Zhang LL, Hanger CC, Gosain AK. 2006. A reinvestigation of murine cranial suture biology: Microcomputed tomography versus histologic technique. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 118 (3):626-634.
- Stoppie N, van der Waerden JP, Jansen JA, Duyck J, Wevers M, Naert IE. 2005. Validation of microfocus computed tomography in the evaluation of bone implant specimens. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 7 (2):87-94.
- Suetens P. 2009. *Fundamentals of Medical Imaging*. Cambridge, UK: Cambridge University.

- Tadros M, Costantino PD. 2008. Advances in Cranioplasty: A Simplified Algorithm to Guide Cranial Reconstruction of Acquired Defects. *Facial Plastic Surgery*, 24 (1):135-145.
- Thomsen JS, Laib A, Koller B, Prohaska S, Mosekilde L, Gowin W. 2005. Stereological measures of trabecular bone structure: comparison of 3D micro computed tomography with 2D histological sections in human proximal tibial bone biopsies. *Journal of Microscopy-Oxford*, 218:171-179.
- Trisi P, Lazzara R, Rao W, Rebaudi A. 2002. Bone-implant contact and bone quality: Evaluation of expected and actual bone contact on machined and Osseotite implant surfaces. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 22 (6):535-545.
- Voigt S, Schneider G. 2009. Das Jenaer Schädelmodell. *Biomaterialien*, 10 (3/4):151.
- von Wilmowsky C, Müller L, Lutz R, Lohbauer U, Rupp F, Neukam FW, Nkenke E, Schlegel KA, Müller FA. 2008. Osseointegration of Chemically Modified Titanium Surfaces: An in Vivo Study. *Advanced Engineering Materials*, 10 (12):61-66.
- Walsh WR, Vizesi F, Michael D, Auld J, Langdown A, Oliver R, Yu Y, Irie H, Bruce W. 2008. beta-TCP bone graft substitutes in a bilateral rabbit tibial defect model. *Biomaterials*, 29 (3):266-271.
- Wang H, Li Y, Zuo Y, Li J, Ma S, Cheng L. 2007. Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 28 (22):3338-3348.
- Wehrhan F, Amann K, Molenberg A, Lutz R, Neukam FW, Schlegel KA. 2012. PEG matrix enables cell-mediated local BMP-2 gene delivery and increased bone formation in a porcine critical size defect model of craniofacial bone regeneration. *Clinical Oral Implants Research*, 23 (7):805-813.
- Westenberger P. 2012. Avizo<sup>(R)</sup> Fire 6.3 Düsseldorf: Westenberger.

- Witte F, Ulrich H, Rudert M, Willbold E. 2007. Biodegradable magnesium scaffolds: Part I: Appropriate inflammatory response. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 81A (3):748-756.
- Xu S, Lin K, Wang Z, Chang J, Wang L, Lu J, Ning C. 2008. Reconstruction of calvarial defect of rabbits using porous calcium silicate bioactive ceramics. *Biomaterials*, 29 (17):2588-2596.
- Yeom H, Blanchard S, Kim S, Zunt S, Chu TMG. 2008. Correlation between micro-computed tomography and histomorphometry for assessment of new bone formation in a calvarial experimental model. *Journal of Craniofacial Surgery*, 19 (2):446-452.
- Zhou X, Zhang Z, Li S, Bai Y, Xu H. 2010. Osteoconduction of different sizes of anorganic bone particles in a model of guided bone regeneration. *British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*.
- Ziegler A, Vens M. 2010. Generalized Estimating Equations. *Methods of Information in Medicine*, 49 (5):421-425.
- Ziegler A, Kastner C, Blettner M. 1998. The Generalised Estimating Equations: An Annotated Bibliography. *Biometrical Journal*, 40 (2):115-139.
- Zorn CJW. 2001. Generalized Estimating Equation Models for Correlated Data: A Review with Applications. *American Journal of Political Science*, 45 (2):470-490.

## **9 Anhang**

### **9.1 Protokolle**

#### **9.1.1 „Jenaer Schädelmodell“**

##### *Voraussetzungen*

1. zylindrische Implantate (Durchmesser: 5 mm, Höhe: 3 mm) mit flachem zylindrischem Deckel (Durchmesser: 9 mm, Höhe: 1 mm), T-Form im Querschnitt
2. Implantation in das Stirnbein der Schädelkalotte
3. Tiermodell mit weiblichen Kaninchen der Rasse New Zealand White Rabbit (Alter bei Implantation: ca. 4 - 6 Monate)
4. Variable Implantationsdauer je nach Versuch (Kurzzeitversuche: 4 Wochen, Langzeitversuche: 3 - 18 Monate)

##### *Implantation der Materialien*

1. Anästhesie der Tiere mit Ketamin<sup>®</sup> (40mg/0,4 ml, verdünnt in 5 ml NaCl) und Rompun<sup>®</sup> (10 mg/0,2 ml, verdünnt in 5 ml NaCl, Wirkstoff: Xylazin) in die Ohröffelvene
2. Rasur der Haut des Schädeldachs, steriles Abdecken
3. Zugang über einen medianen Hautschnitt, Wegklappen der Haut und des Periosts
4. Einbringen der Löcher für die Implantate in die Schädeldecke mit einem Trepan-Bohrer, Löcher entsprechen in ihrer Größe den passgenau einzusetzenden Implantaten
5. Dura im Bereich der Bohrlöcher entfernen (für direkten Kontakt der Implantate zu Liquor cerebrospinalis und Hirngewebe)
6. Einsetzen der Implantate in die Trepanations-Löcher
7. Verschluss von Periost und Haut durch resorbierbares Nachtmaterial (Marlin- 4-0, Catgut GmbH) und Pflasterspray
8. antibiotische Einmaldosis (Baytril<sup>®</sup>, Enrofloxacin)

### *Explantation der Materialien*

1. Tiere schmerzfrei mit Barbiturat (Pentobarbital-Natrium) euthanasieren
2. Zugang zur Schädeldecke über einen medianen Hautschnitt, Haut seitlich wegklappen
3. Implantatregion makroskopisch beurteilen
4. über den Implantaten liegendes Bindegewebe (bzw. Periost) entnehmen, in 5 % Formalin fixieren
5. Proben des Hirngewebes unter den Implantaten sowie Kontroll-Probe aus einer anderen Region der Großhirnrinde entnehmen, in 5 % Formalin fixieren

### *Anfertigung von Hart- und Weichgewebhistologien*

1. Hartgewebhistologien durch Trenndünnschlifftechnik nach Donath anfertigen und nach laborinternen Protokollen färben (Hämatoxylin-Eosin; modifizierte Masson-Goldner-Trichrom)
2. Weichgewebhistologien nach laborinternen Protokollen herstellen und in Hämatoxylin-Eosin färben

### *Lichtmikroskopische Beurteilung der Präparate*

1. Präparate entsprechend dem Schema des „Jenaer Schädelmodells“ ausrichten, d.h. der Implantatdeckel befindet sich unter dem Mikroskop oben
2. Beurteilung der Biokompatibilität der Materialien anhand der histologischen Präparate, je nach Versuch variabel

### **9.1.2 Anfertigung der Hartgewebhistologien nach der Trenn-Dünnschliff-Technik von Donath**

1. Proben mindestens 7 - 14 Tage in 5 % Formaldehyd einlegen
2. Entwässerung der Proben in der aufsteigenden Alkoholreihe  
→ je nach Größe jeweils 2 bis 3 Tage in 50 %, 70 %, 80 %, 96 % und zweimal für 2 Tage in 100 % Ethanol
3. Infiltration der Proben in lichtundurchlässigen Gefäßen für 2-3 Tage mit Ethanol-Technovit<sup>®</sup> -7200-Gemisch 1:1 und anschließend 3 Tage mit Technovit<sup>®</sup> 7200
4. Einbetten in Technovit<sup>®</sup> 7200 und Polymerisation mit dem EXAKT 520-Lichtpolymerisationsgerät  
→ jeweils 4 Stunden bei niedriger Lichtintensität (gelbes Licht) und anschließend 6 Stunden bei hoher Lichtintensität (blaues Licht)
5. die ausgehärteten Technovit<sup>®</sup>-Blöcke mit der Probe auf einen Objektträger unter einer EXAKT 402-Präzisionsklebepresse für 15 min mit Druck und Blaulicht kleben
6. Block mit dem EXAKT 300-Diamantbandsäge an der gewünschten Schnittstelle absägen
7. Schnittflächen mit EXAKT 400 CS-Tellerschleifgerät (Mikroschleifsystem) planschleifen
8. die Schichtdicke des Präparats messen und einen neuen Objektträger mit Technovit<sup>®</sup> 7210 aufkleben
9. die Schichtdicke des Klebers ermitteln und anschließend erfolgt die Herstellung eines neuen Schliff mit der EXAKT-Diamantbandsäge mit einer Schichtdicke von 200 - 300 µm
10. die Herstellung des Dünnschliffs erfolgt mit dem EXAKT-Mikroschleifsystem stufenweise mit Schleifpapier unterschiedlicher Körnungen (320, 500, 800, 1000, 1200)
11. Polieren der Dünnschliffe auf eine Schichtdicke zwischen 5 - 15 µm mit Polierpapier (4000)
12. Färbung der Schliffpräparate mit Hämatoxylin-Eosin oder modifizierter Masson-Goldner nach Protokoll



### **9.1.3 Anfertigung der Weichgewebhistologien**

1. Gewebe für 7 - 14 Tage in 5 % Formalin fixieren
2. Spülen in Aqua dest. für 10 min
3. jeweils 60 min in 50 %, 70 %, 90 % und 96 % Ethanol entwässern
4. zweimal 30 min in 100 % Ethanol entwässern
5. zweimal 30 min mit Roti<sup>®</sup>-Histol infiltrieren
6. Infiltration des Gewebes in Schnappdeckelgläschen mit flüssigem Paraffin zweimal über Nacht bei 60 °C im Wärmeschrank, Gläschen dabei geöffnet lassen
7. In Blockschälchen gießen, Proben aushärten lassen
8. den Paraffinblock auf einen Träger (Einbettkassette) bringen
9. Schneiden der Blöcke am Mikrotom auf Schichtdicke von 3 - 10 µm
10. Schnitte ins Streckbad bei 40 °C einbringen und glätten lassen
11. auf einen Objektträger aufziehen
12. Trocknen der Schnitte vor dem Färben für 20 min bei 45 - 60 °C
13. Schnitte in Roti<sup>®</sup>-Histol entparaffinieren und rehydrieren
14. nach Färbeprotokoll mit Hämatoxylin-Eosin (HE) einfärben

### **9.1.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Weichgewebhistologien**

1. Schnitte entparaffinieren und rehydrieren mit absteigender Alkoholreihe  
→ 2 x 10 min in Roti<sup>®</sup>-Histol, 2 x 5 min in 100 % Ethanol, je 10 min 96 %, 80 %, 70 %, 50 %, Aqua dest.
2. Proben in Hämatoxylin für 20 - 30 min einlegen
3. Spülen in Aqua dest. für 1 min
4. Spülen unter fließendem Leitungswasser für 15 min
5. Spülen mit Aqua dest. für 1 min
6. Färben in 0,5 %iger Eosin-G-Lösung für 3 min
7. kurzes Spülen mit Leitungswasser
8. Entwässern über die aufsteigende Alkoholreihe (80 - 96 - 100%) jeweils für 1 - 2 min
9. kurz in Roti<sup>®</sup>-Histol schwenken
10. Eindeckeln des Dünnschliffs mit Roti<sup>®</sup>-Histokitt

### **9.1.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Hartgewebephistologien**

1. Schliffe mit 1:1 Aceton/Ethanol-Gemisch abwischen, Proben in Hämatoxylin für 20 - 30 min einlegen
2. Proben in Hämatoxylin für 35 min einlegen
3. Spülen in Aqua dest. für 1 min
4. Spülen unter fließendem Leitungswasser für 15 min
5. Spülen mit Aqua dest. für 1 min
6. Färben in 0,5 % iger Eosin-G-Lösung für 7 min
7. kurzes Spülen mit Leitungswasser
8. Entwässern über die aufsteigende Alkoholreihe (80-96-100 %) jeweils für 1-2 min
9. kurz in Roti<sup>®</sup>-Histol schwenken
10. Eindeckeln des Dünnschliffs mit Roti<sup>®</sup>-Histokitt

### **9.1.6 Modifizierte Masson-Goldner-Färbung der Hartgewebephistologien**

1. Schliffe mit 1:1 Aceton/Ethanol-Gemisch abwischen
2. in Hämatoxylin für 35 min einlegen
3. Spülen in Aqua dest. für 1 min
4. in Ponceau-Säurefuchsin für 20 min
5. kurz in Aqua dest. einlegen
6. in 1 %ige Essigsäure für 1 min einlegen
7. in Phosphorwolframsäure-Orange-G für 20 min einlegen
8. kurz in Aqua dest. einlegen
9. in 1 %ige Essigsäure für 1 min
10. in Anilinblau-Orange-Eisessig für 8 min
11. in Aqua dest. spülen
12. Entwässern über die aufsteigende Alkoholreihe (80-96-100 %) jeweils für 1-2 min
13. kurz in Roti<sup>®</sup>-Histol schwenken
14. Eindeckeln des Dünnschliffs mit Roti<sup>®</sup>-Histokitt

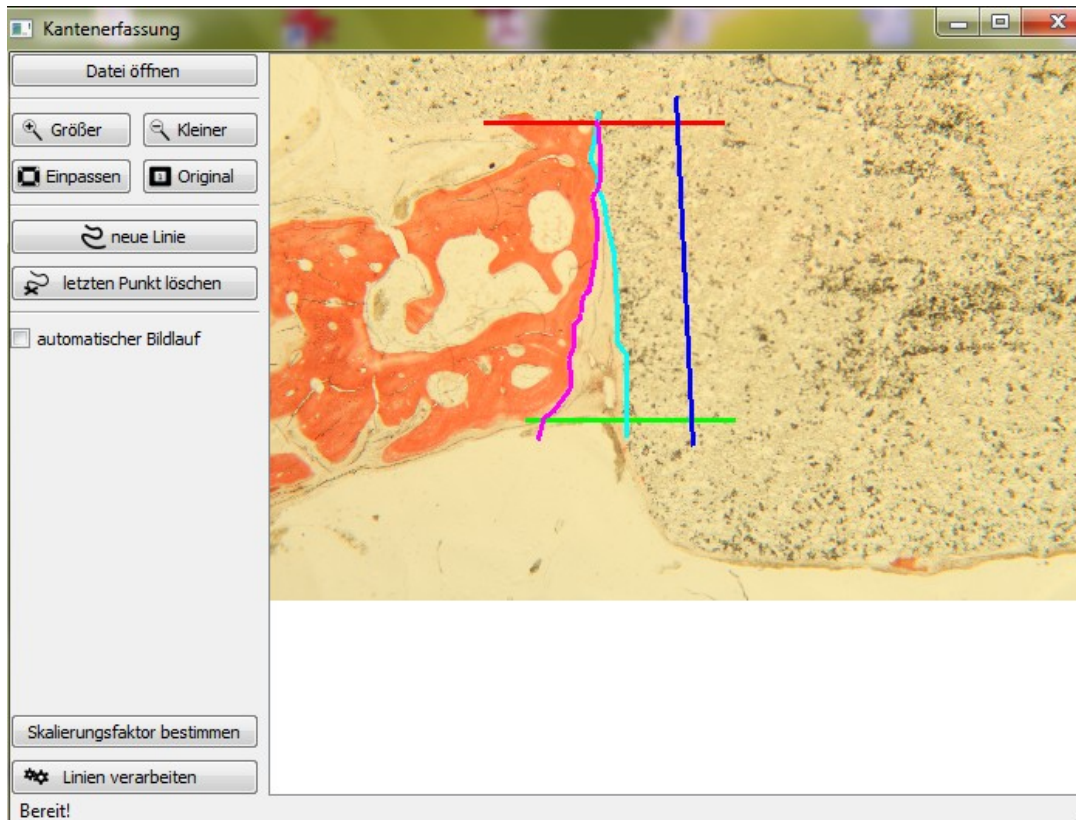
## 9.2 Anzahl der histologischen Schnitte für die Auswertung

Tiernummer	linke Seite des Implantats	rechte Seite des Implantats
13	3	5
14	3	7
15	6	6
16	4	4
17	3	2
18	4	4
19	8	7
20	7	8
21	4	8
22	7	8
23	8	8
24	7	7
25	9	8
26	6	4
27	6	8
28	8	9
29	8	8
30	6	5
Anzahl insgesamt	107	116


## 9.3 Graphische Benutzeroberfläche (GBO)






### 9.3.1 „Histo-Gap“

1. Fenster: Übersicht und Einlesen des Bildes im JPEG-Format



## 2. Fenster: Legende und Beschriftung der eingezeichneten Linien

 Linien verarbeiten

	Farbe	Punkte	Bezeichnung
1		2	<input type="text" value="obere Begrenzung"/>
2		2	<input type="text" value="untere Begrenzung"/>
3		2	<input type="text" value="Senkrechte Referenz"/>
4		15	<input type="text" value="Implantat"/>
5		23	<input type="text" value="Knochen"/>

### 3. Fenster: Beschriftung des Spaltes und Eingabe der Begrenzungen

← Linien verarbeiten

Neuer Spalt:

aktueller Spalt:  ☒ sichtbar

Begrenzung oben:

Hinterschneidung links:

Rand links:

senkrechte Referenz:

Rand rechts:

Hinterschneidung rechts:

Begrenzung unten:

#### 4. Fenster: Eingabe der Randbedingungen eines Versuchs

Linien verarbeiten

Bildname: T 20. 3. 4 links

aktuelle ID: 346

Projekt-Nummer:

Tier-Nummer:

Position im Tier:

Seite:

Implantatmaterial:

Schnittnummer:

Verweildauer im Tier:

Methode (2D/3D):

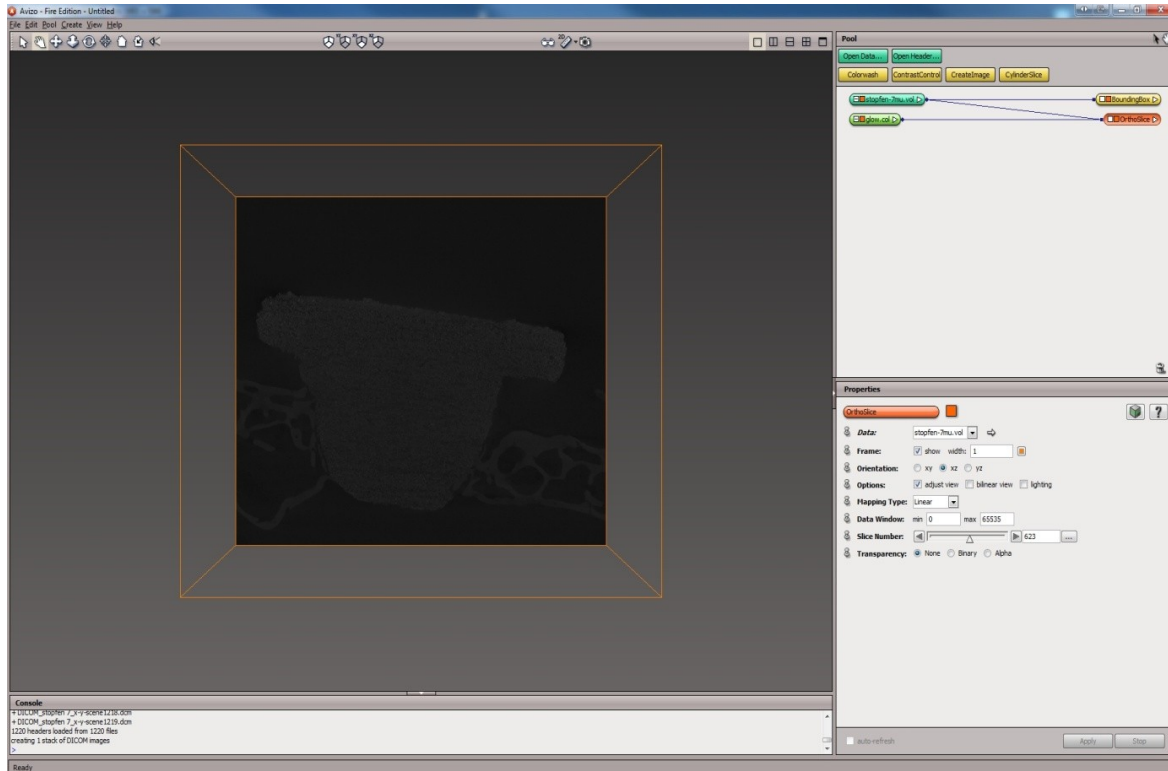
Färbung:

Datum:

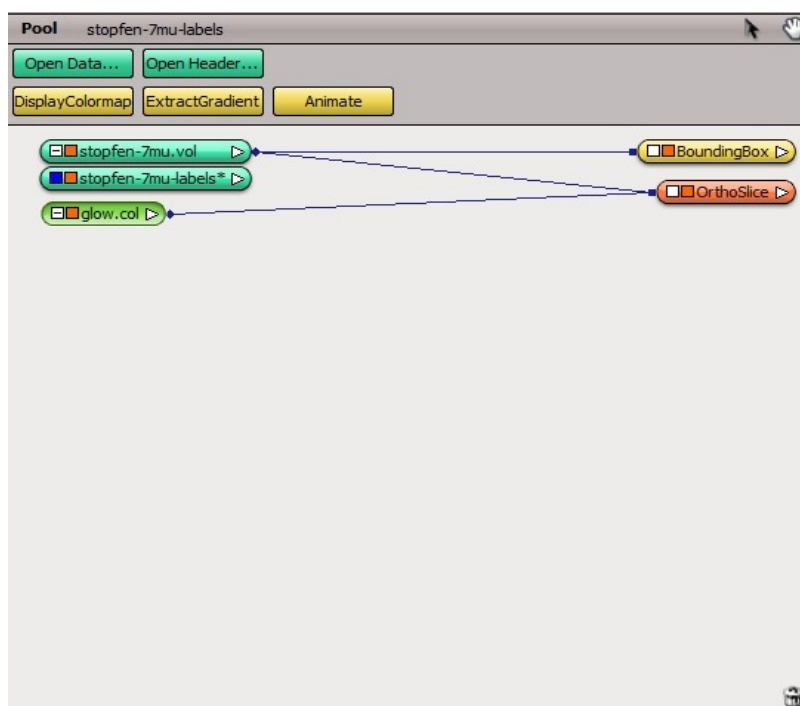
Benutzer:

### 9.3.2 Avizo® Fire 6.3

Übersichtsbildschirm:

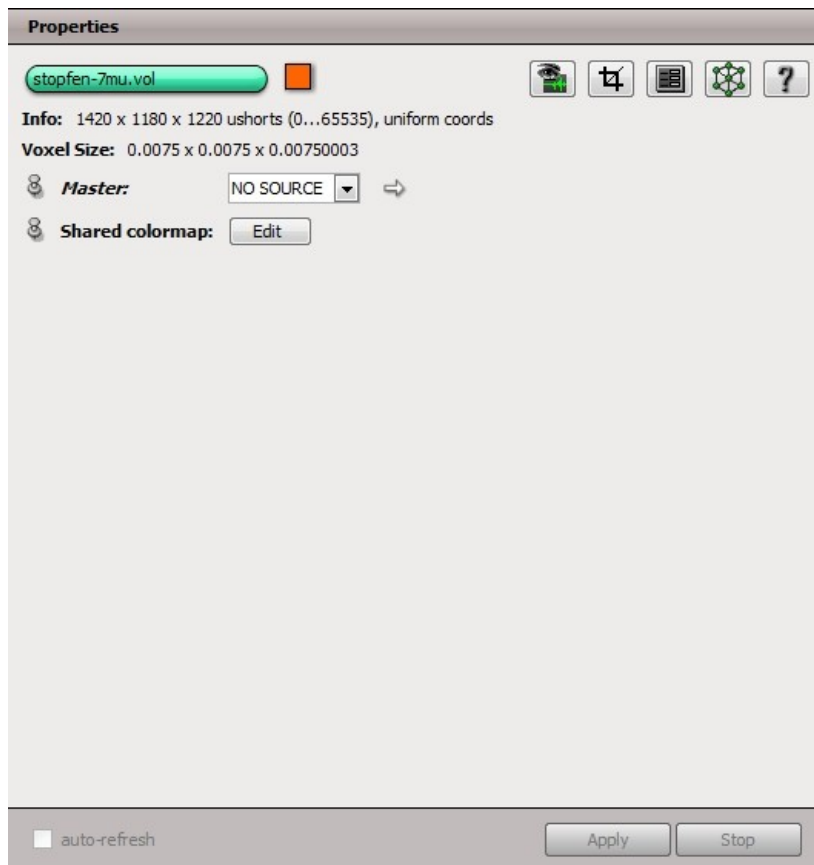


- Pool: alle ausgewählten Dateien und Tools

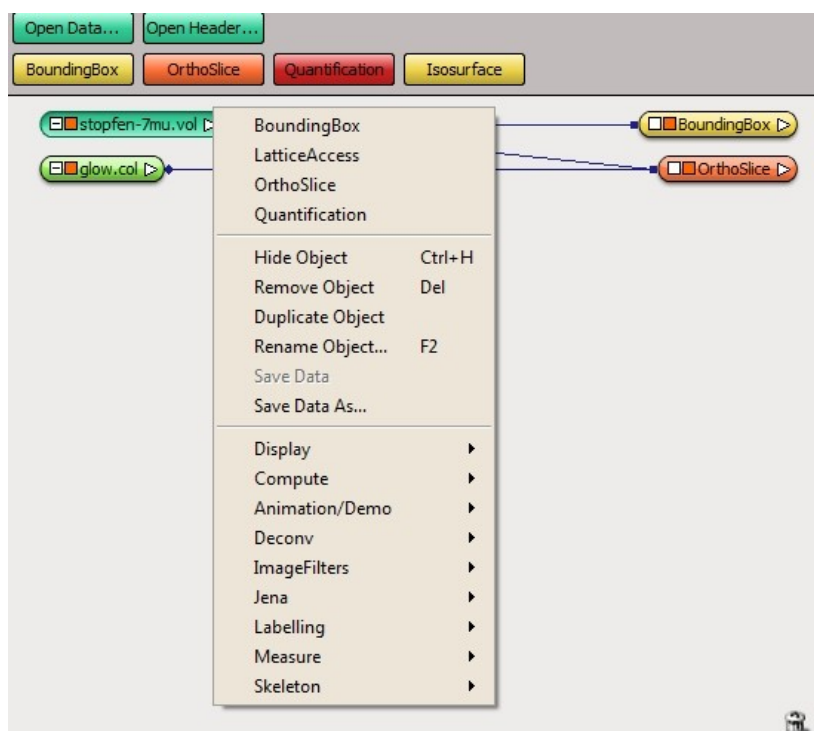




- Properties: enthält Informationen zur Datei und den Tools

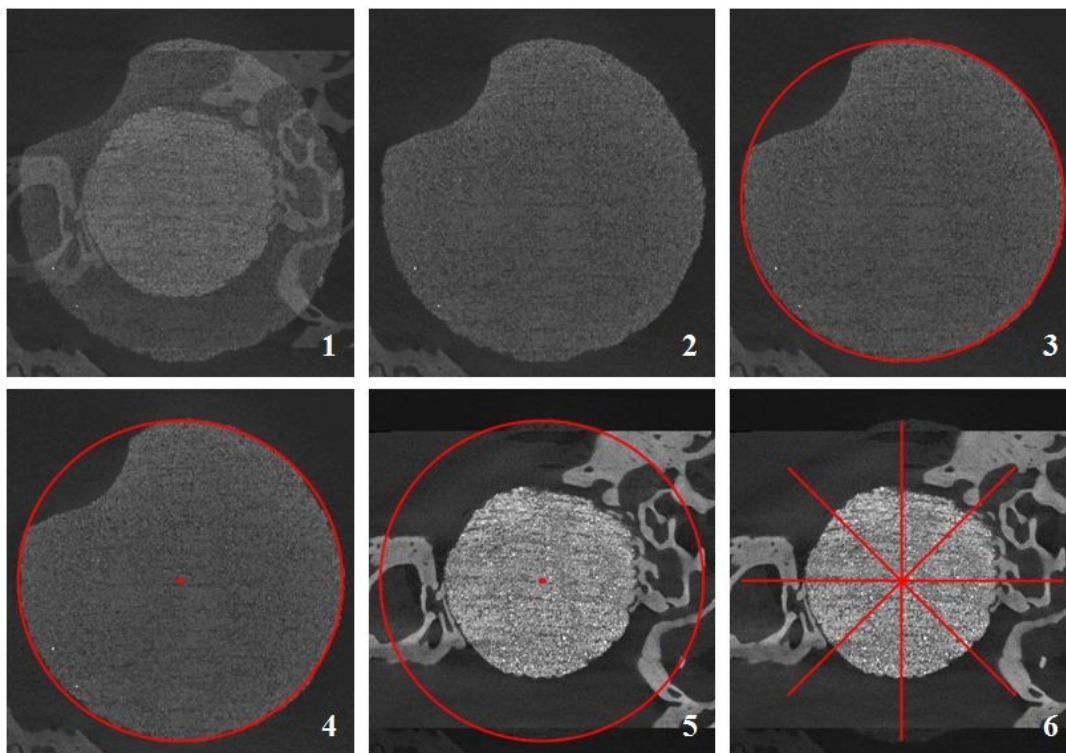


- Menüfenster:



#### 9.4 Algorithmus zum Export virtueller 2D-Schnitte aus Avizo® Fire 6.3

Per definitionem sollten alle virtuellen Schnitte der Serie durch die Rotationsachse des Objektes (1) verlaufen. Für das Auffinden dieser Achse wurde zunächst die senkrecht zu dieser Rotationsachse orientierte Oberseite des „Deckels“ des Implantats im 3D-Datensatz gesucht und als Ebene (2) definiert. Dies erfolgte, indem durch den 3D-Datensatz ein virtueller Schnitt gelegt wurde, der möglichst präzise und parallel auf der Oberseite des Implantats lag. Anschließend wurde mittels des Avizo-Skripts „cylinder iv“ Größe und Position einer Kreisfläche an den kreisähnlichen Umriss der Implantat-Oberseite adaptiert (3) und damit der Mittelpunkt dieser Kreisfläche definiert (4). Durch diesen markierten Mittelpunkt verlief senkrecht zur Ebene des Deckels die Rotationsachse des Implantats. Mit Hilfe des Avizo-Skripts „Rotate-Slice“ erfolgte eine virtuelle 360°-Rotation (5) des Implantats um die ermittelte Achse, wobei in vorher festgelegten Winkelabständen (in diesem Fall 6°) „tortenschnittartig“ (6) virtuelle 2D-Schnitte des Probekörpers erstellt wurden. Diese Bilder wurden im JPEG-Format exportiert und anschließend zum Vergleich mit den Hartgewebephistologien desselben Tieres mit Hilfe der Software „Histo-Gap“ morphometrisch ausgewertet.



## **9.5 Manuals der Software-Anwendungen**

### **9.5.1 „Histo-Gap“**

#### Allgemeine Bedienung der Software

1. Datei öffnen
2. Größe mit Button „Größer“ oder „Kleiner“ festlegen
3. Button „neue Linie“ für das Zeichnen einer Linie drücken, um vorherige Punkte zu löschen  
den Button „letzten Punkt löschen“ drücken
4. Button „Linie beenden“ drücken, wenn das Zeichnen der Linie beendet ist
5. für weitere Linien den Vorgang wiederholen

#### Standardisierter Ablauf einer Messung

1. Punkte unter „Allgemeine Bedienung der Software“ durchführen
2. Zunächst eine obere und untere Grenzlinie einzeichnen, um den Anfang und das Ende der Messstrecke festzulegen, alle weiteren senkrechten Linien müssen diese überschneiden
3. dann eine Linie für die senkrechte Referenz einzeichnen
4. das Implantat, Knochen usw. mit einer neuen Linie bezeichnen
5. wenn alle gewünschten Linien eingezeichnet sind, dann Button „Linien verarbeiten“ drücken, daraufhin erscheint eine Übersicht mit der Legende
6. die Namen für die eingezeichneten Linien in Übersicht eintragen
7. „Next“ drücken
8. nächste Übersicht (Spaltenbezeichnung) erscheint, nun den Namen einer neuen Spalte eingeben und auf „Neu“ klicken, danach Begrenzung des Spaltes definieren
9. Auf „Next“ klicken, weitere Übersicht (Randbedingungen) erscheint
10. Felder ausfüllen, auf „Finish“ klicken
11. Tabelle mit Messwerten und Tabelle mit Randbedingungen werden erzeugt und in den Ordner importiert, in welchem sich das ausgewählte Bild befindet

### Vorgehensweisen bei einem Knochen-Implantat-Abstand von 0 $\mu\text{m}$

1. zunächst die Linien zur Kennzeichnung des Messbereiches und eine Linie für die senkrechte Referenz einzeichnen
2. Linie für das Implantat einzeichnen
3. Linie für den Knochen muss diese Linie überschneiden
  - 3.1 bei linker Seite nach links über diese Linie zeichnen
  - 3.2 bei rechter Seite nach rechts über diese Linie zeichnen

### **9.5.2 Avizo<sup>®</sup> Fire 6.3**

#### 1. Öffnen eines Datensatzes

1. Avizo<sup>®</sup> Fire 6.3 öffnen
2. auf Button „Open Data“ drücken
3. jeweiliges Laufwerk mit gewünschter Datei heraussuchen

#### 2. Speichern eines Datensatzes

Speicherformate:

- am = Amira Mesh, gesamte Datei mit Arbeitsschritten wird gespeichert
- hx = Arbeitsschritte werden gespeichert

1. Datensatz unter „Save Network as“ im Menü in Leiste am oberen Bildschirmrand speichern, Datei wird im hx-Format gespeichert
2. Datei unter „Save Data as“ im Menü in Leiste am oberen Bildschirmrand speichern, Datei wird im .am-Format gespeichert

- beim Öffnen eines gespeicherten Datensatzes die hx-Datei mit Arbeitsschritten und am-Datei zusammen öffnen

### 3. Bearbeitung eines Datensatzes

#### 3.1 Visualisierung eines Datensatzes

*Beachte: Menüs durch einen Rechtsklick auf geöffnete Datei aufrufbar  
unter den verschiedenen Menüunterpunkten sind weitere Optionen wählbar*

1. Datei öffnen
2. „Bounding Box“ erstellen, ein farblicher Rahmen erscheint
3. „Ortho Slice“ im Menü unter „Display“ aufrufen,  
mit diesem Tool kann durch den Datensatz gescrollt werden
4. „Oblique Slice“ im Menü unter „Display“ aufrufen,  
mit diesem Tool kann durch den Datensatz schräg gescrollt und rotiert werden
5. „Filtered Oblique Slice“ im Menü unter „Display“ aufrufen,  
mit diesem Tool lassen sich z.B. der Kontrast eines Datensatzes und andere Bildqualitäten verändern

#### 3.2 Veränderung der Datensatzgröße

*Geeignet für große Datensätze die eine hohe Rechenleistung benötigen*

1. Datei öffnen
2. unter Compute im Menü das Feld „Resampling“ öffnen
3. unter Properties bei „Resolution“ lässt sich nun die Auflösung verändern
4. „Apply“ drücken
5. neue Datei „x.resampled“ wird erzeugt

#### 3.3 Ausschneiden von Objekten aus Übersicht

1. Datei öffnen
2. „Bounding Box“ erstellen
3. „Ortho Slice“ öffnen
4. „LatticeAccess“ im Menü öffnen, blaue Box wird erstellt

5. Cursortaste links am oberen Bildschirmrand anklicken und damit die Box auf Größe des gewünschten Ausschnittes verändern
6. wenn gewünschte Größe erreicht dann „Apply“ rechts unten am Bildschirmrand drücken, neu erstellter Datensatz „x.view“ wird erzeugt
7. weiteres „Ortho Slice“ öffnen, um neues Bild sichtbar zu machen

### 3.4 Koordinatensystem festlegen

- gekippte Objekte können durch das virtuelle Koordinatensystem wieder in eine aufrechte Position gebracht werden
- hilfreich für die Implantate im gewölbten Schädelknochen



1. Datei öffnen
2. „Bounding Box“ erstellen
3. „Apply Transform“ im Menü unter „Compute“ anklicken
4. unter Apply Transform die Referenz „Oblique Slice“ auswählen
5. „Apply“ drücken
6. neuer Datensatz „x.transformed“ wird erstellt
7. zur Darstellung des neuen Datensatzes eine Bounding Box und OrthoSlice aufrufen

### 4. Mittelpunkt einer Kreisfläche ermitteln

1. Datei öffnen
2. „Bounding Box“ erstellen
3. gewünschte Fläche mit Hilfe von „Ortho Slice“ und „Oblique Slice“ einrichten, dazu Orientierung unter Properties bei diesen Tools verändern
4. im Menü unter Jena „cylinder2.iv“ öffnen
5. unter Properties auf dreieckiges Symbol drücken
6. dreidimensionales Gerüst erscheint, besitzt ein grünes Kreuz und einen weißen Rahmen,
  - grünes Kreuz dient zur Ausrichtung des Kreises im Raum
  - weißer kreisförmiger Rahmen dient zur Anpassung der Fläche an den Mittelpunkt
7. Gerüst entsprechend an die Ebene adaptieren
8. unter „cylinder 2.iv“ auf Dialog-Fenster klicken
  - Fenster mit Winkel und Koordinaten des Mittelpunktes wird geöffnet

- Koordinaten des Mittelpunktes befinden sich unter „Translate“
- 9. anschließend Koordinaten des Mittelpunktes im Tool „RotationSlice“ eingeben

## 5. Rotation von Objekten

1. Datei öffnen
2. „Bounding Box“ erstellen
3. „Oblique Slice“ anklicken
4. unter „Jena“ die Funktion „Rotate Slice“ öffnen
5. unter Properties „Data“ die genutzte Datei auswählen
6. unter Properties „Degree“ das Symbol  anklicken, „Configure“ auswählen
7. daraufhin öffnet sich weiteres Menü
8. unter „Min value“ und „Max value“ den Bereich auswählen in welchen Bilder erzeugt werden sollen
9. unter „Increment“ die Schrittweite, in welcher die Bilder erzeugt werden, in „°“ festlegen
10. „OK“ drücken
11. unter „Axis“ die Anzahl der Achsen um die sich Objekt drehen soll einstellen
  - 1 = eingeschaltet, 0= ausgeschaltet (Achse = 001)
12. Haken bei „Create image“ setzen
13. auf Browse klicken und Ordner festlegen, in dem die Bilder gespeichert werden sollen
14. für Play auf  drücken
15. Bilder werden automatisch in Ordner exportiert und als Tiff-Datei abgespeichert

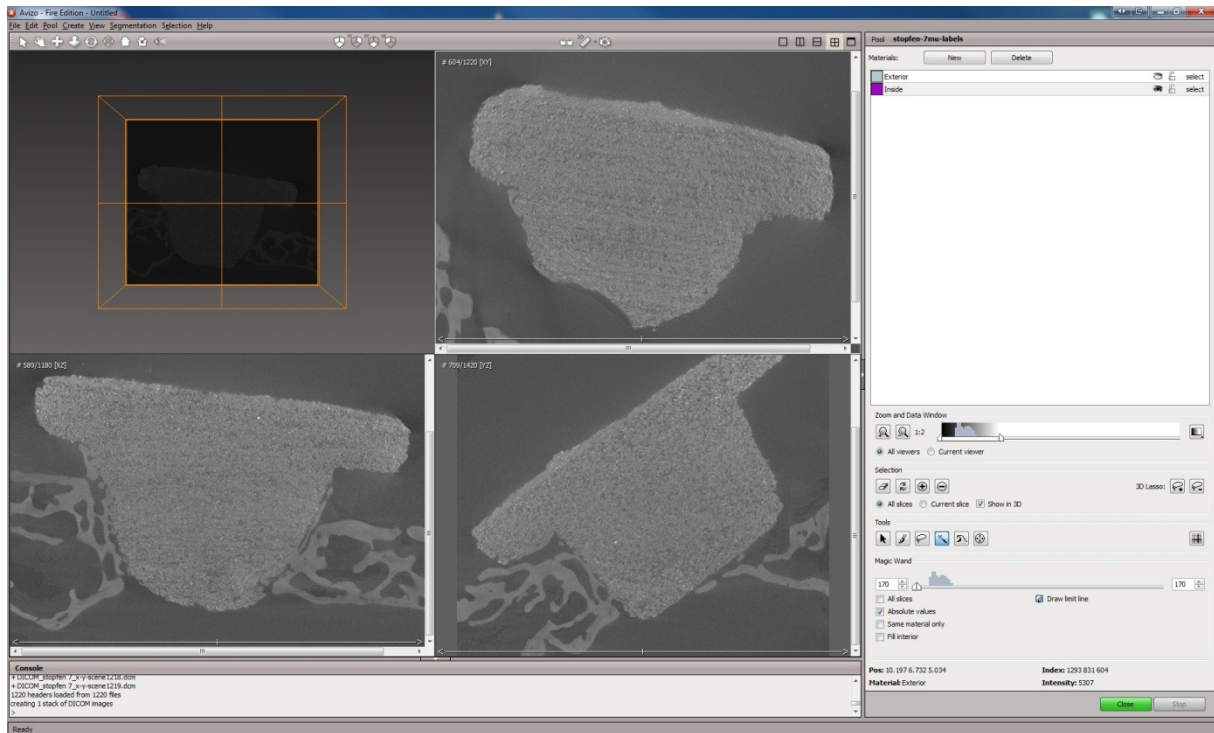
## 6. Segmentierung von 3D-Datensätzen

- verschiedene Werkzeuge in Avizo® Fire 6.3 enthalten
- eigenes Tool für automatische und manuelle Segmentierung vorhanden
- zusätzliche Tools für Watershed- und Threshold-Segmentierung

### 6.1 Segmentierung mit Hilfe von „LabelField“

1. Datei öffnen
2. unter Labeling im Menü „LabelField“ auswählen

3. neue graphische Benutzeroberfläche (GBO) öffnet sich:



4. enthält verschiedene Werkzeuge und Ausschnitte zur Segmentierung (z.B. Region Growing)
5. mit Werkzeugen (z.B. Magic Wand) lassen sich bestimmte Ausschnitte im Bild markieren
6. zum Sichtbarmachen einer Markierung im Übersichtsfenster auf „All slices“ unter Magic Wand auswählen
7. unter „Materials“ kann dem Objekt ein Name gegeben werden
  - dazu Rechtsklick auf „Exterior“ oder „Interior“, dann „Rename-Material“ anklicken
  - unter „New“ kann weiteres Material hinzugefügt werden
8. wenn alle gewünschten Objekte ausgewählt sind, „Close“ (grüner Button) drücken
9. neue Datei „x-labels“ entsteht
10. „Ortho Slice“ zum sichtbar machen der segmentierten Elemente auswählen



## 6.2 Segmentierung nach einem Schwellenwert (Threshold)

1. Datei öffnen
2. „Bounding Box“ erstellen
3. „Ortho Slice“ öffnen
4. unter Labeling im Menü „Label Voxel“ öffnen
5. Suche nach geeigneten Schwellenwert durch Histogramm unterstützt
6. unter Action das Feld „Histo“ anklicken
7. Histogramm mit der Verteilung der Pixel entsprechen der Helligkeitswerte wird erstellt, erleichtert Suche eines geeigneten Schwellenwertes unter Properties im Feld „Exterior-Inside“ den Schwellenwert eingeben
8. Apply drücken
9. Datei „x.Labels“ wird erzeugt, enthält den segmentierten Datensatz

## 6.3 Watershed-Segmentierung

1. Datei öffnen
2. „Bounding Box“ öffnen
3. „Ortho Slice“ auswählen
4. im Menü unter Labeling die „Watershed-Segmentation“ aufrufen
5. Nutzer wird schrittweise durch das Tool geleitet, Arbeitsschritte werden erläutert unter Properties im Feld „Preperation“ unter Properties im Feld „Num Phase“ die Anzahl der Materialien eines Objektes eingeben  
z.B. Knochen, Implantat, Titan, Knorpel
6. nach Bearbeitung aller Schritte wird Datensatz „x.watershed“ erstellt

## 9.6 Ergebnistabellen der Histomorphometrie-Softwares

### 9.6.1 Erste Histomorphometrie-Software

<b>Präparat 13.2.1 rechts</b>	
Mittelwert:	0,45460239
Standardabweichung:	1,89049208
Median:	0
BIC[pro 1]:	0,945
BIC[µm]:	0
Raster	Abstand
0	1,78034897
0,005	1,990779
0,01	2,20120903
0,015	2,41163906
0,02	2,62206909
0,025	2,83249912
0,03	3,04292914
0,035	3,25335917
0,04	3,4637892
0,045	3,67421923

### 9.6.2 „Histo-Gap“

ID	<u>Tiefe_relativ</u>	<u>Tiefe_absolut</u>	Breite Spalt 1	Breite Spalt 2	Breite Spalt n
222	0	0	51.673	499.797	
222	1	159.778	499.253	482.626	
222	2	319.557	481.775	465.454	
222	3	479.335	464.298	448.283	
222	4	639.114	44.682	431.112	
222	5	798.892	429.343	41.394	
222	6	958.671	44.446	429.364	
222	7	111.845	552.889	538.099	
222	8	127.823	661.318	646.834	
222	9	143.801	769.747	75.557	
222	10	159.778	858.229	845.299	

## 9.7 Zahlencodierungen für SPSS Statistics®

Benutzer: Acer	= 510
Avizo	= 520

Seite: rechts	= 310
links	= 320

Ort: Schädelkalotte	= 410
---------------------	-------

Material: Polymer	= 110
Composit bearbeitet	= 120
Composit nicht bearbeitet	= 130
TCP	= 140
Bioverit	= 150
Titan	= 160

Polymerkomponente:	
UM	= 210
UD	= 220

Methode: 2D	= 610
3D	= 620

Färbung: HE	= 710
MG	= 720

## 9.8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des menschlichen Schädelknochens (Schünke et al. 2006)	4
Abbildung 2: Implantatkörper mit Deckel und zylindrischem Grundkörper	14
Abbildung 3: Schema des „Jenaer Schädelmodells“	16
Abbildung 4: Einteilung der beiden Versuchsgruppen	18
Abbildung 5: Implantation der Probekörper, 1) Eröffnung der Schädeldecke, 2) Einbringen der Löcher, 3) Einsetzen der Implantate in Schädelkalotte	18
Abbildung 6: Explantation der Probekörper, 1) Composit unbearbeitet, 2) Composit bearbeitet, 3) Polymer-Kontrolle, 4) TCP-Kontrolle	19
Abbildung 7: Implantat eingebettet in Technovit®	20
Abbildung 8: 1) Polymer-Kontrolle, 2) Composit bearbeitet, 3) Composit unbearbeitet, 4) TCP-Kontrolle; 31,25fache Vergrößerung, modifizierte MG-Färbung (1 und 4), HE-Färbung (2 und 3)	22
Abbildung 9: Graphische Benutzeroberfläche der Software von 2011	23
Abbildung 10: Region of Interest der Hartgewebhistologien	27
Abbildung 11: Benutzeroberfläche der Software „Histo-Gap“ und Legende zu den Linien	27
Abbildung 12: Schematischer Aufbau eines herkömmlichen $\mu$ CT-Geräts (Neuser und Sommerfeld 2007)	30
Abbildung 13: Übersicht der Implantate im CT-Scan, mit 1) Polymer-Kontrolle, 2) Composit bearbeitet, 3) Composit unbearbeitet, 4) TCP-Kontrolle, 5) Knochen	32
Abbildung 14: Darstellung eines herausgeschnittenen Bereichs im 2D-Schnittbild mit der Funktion „Lattice Access“	35
Abbildung 15: Aufnahme eines Volumendatensatzes der Implantate, 1) TCP-Kontrolle, 2) Composit unbearbeitet, 3) Composit bearbeitet, 4) Polymer-Kontrolle	36
Abbildung 16: „Ortho-Slice“ durch den 3D-Datensatz eines Implantats, gelb markierte „Bounding Box“	36
Abbildung 17: ROI in einem virtuellen 2D-Schnitt	39
Abbildung 18: Verteilung der Daten	41
Abbildung 19: Algorithmus bei einem direkten Knochen-Implantat-Kontakt in der Software „Histo-Gap“	47
Abbildung 20: Graphischen Benutzeroberfläche der zweiten Betaversion	49
Abbildung 21: Auswertungstabelle der dritten Betaversion	49
Abbildung 22: Benutzeroberfläche der Software „Histo-Gap“	51

Abbildung 23: Auszug aus der Tabelle mit den Messwerten	51
Abbildung 24: Auszug aus der Tabelle mit den Rahmenbedingungen einer Messung	51
Abbildung 25: Boxplot mit Darstellung der Streuung der Daten nach 3, 6 und 9 Monaten	53
Abbildung 26: Zusammenhang zwischen dem BIC und der Position entlang des Schädelknochens von außen nach innen	54
Abbildung 27: Resorption Grad 1, schwarz umrandetes TCP-Präparat, modifizierte MG- Färbung, 20fache Vergrößerung	59
Abbildung 28: Resorption Grad 2, schwarz umrandetes TCP-Präparat, modifizierte MG- Färbung, 20fache Vergrößerung	59
Abbildung 29: Resorption Grad 3, schwarz umrandetes TCP-Präparat, modifizierte MG- Färbung, 20fache Vergrößerung	60
Abbildung 30: Resorption Grad 4, schwarz umrandetes TCP-Präparat, HE-Färbung, 20fache Vergrößerung	60
Abbildung 31: TCP-Resorption 3, 6 und 9 Monaten nach Implantation, Gradeinteilung nach modifizierten Score nach Brandt et al. 2010	61
Abbildung 32: „Ortho Slice“ eines TCP-Polymer-Composit-Implantats, Avizo® Fire 6.3	63
Abbildung 33: Ergebnis der Segmentierung nach einem Schwellenwert von 9367 bis 28557, Markierung den Knochens und Implantats im Datensatz „T 27.3“	64
Abbildung 34: Helligkeits-Histogramm für einen 3D-Datensatz, x-Achse: Grauwerte, y- Achse: Helligkeitswerte, Avizo® Fire 6.3	64
Abbildung 35: Resultat des Edge-Detection-Sobel-Filters, Avizo® Fire 6.3	65
Abbildung 36: Ergebnis der Watershed-Segmentierung, Avizo® Fire 6.3	66
Abbildung 37: Prinzip des Region Growings, Avizo® Fire 6.3	67
Abbildung 38: Modul zum Auffinden des Mittelpunkts des Implantatdeckels	68
Abbildung 39: Fremdkörperriesenzelle, nicht bearbeitetes Composit-Implantats, HE-Färbung, 500fache Vergrößerung	71
Abbildung 40: Granulozyt, bearbeitetes Composit-Implantat, HE-Färbung, 500fache Vergrößerung	72
Abbildung 41: Fremdkörperriesenzelle, nicht bearbeitetes Composit-Implantat, HE-Färbung, 500fache Vergrößerung	72

## 9.9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht zum Dateninput, zur Datenstruktur und graphischen Benutzeroberfläche von „Histo-Gap“	26
Tabelle 2: Scanbedingungen der $\mu$ CT-Aufnahmen	31
Tabelle 3: automatisch und manuell eingelesene Randbedingungen	45
Tabelle 4: Zusammenfassung der wesentlichen Kennzeichen der Betaversionen	48
Tabelle 5: Vergleich der beiden Software-Anwendungen	52
Tabelle 6: BIC der Implantate mit der Polymerkomponente UM nach 3, 6 und 9 Monaten	55
Tabelle 7: BIC der Implantate mit der Polymerkomponente UD nach 3, 6 und 9 Monaten	55
Tabelle 8: BIC der Implantate in der Gruppe mit UM-Komponente nach 3, 6 und 9 Monaten	56
Tabelle 9: BIC der Implantate in der Gruppe mit UD-Komponente nach 3, 6 und 9 Monaten	57
Tabelle 10: Zusammenfassung der Ergebnisse der Hirngewebsschnitte	73

## 9.10 Danksagung

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr.med. G. Schneider, die meine Arbeit intensiv und engagiert betreut hat. Durch ihr fachliches Wissen, kritisches Hinterfragen und Aufzeigen neuer Denkansätze brachte sie meine Arbeit Schritt für Schritt voran. Durch ihre Hilfs- und Einsatzbereitschaft fühlte ich mich stets gut aufgehoben. Vielen Dank für die vielen Korrekturstunden und wertvollen Ratschläge.

Ebenfalls gilt ein sehr großer Dank den Mitarbeitern des Biomateriallabors der Klinik für HNO Jena: Herrn D. Linde und Frau S. Voigt sowie Frau K. Otto. Sie haben mich stets motiviert, emotional unterstützt und mir intensiv beim Erreichen meiner Ziele geholfen. Sie waren immer zuverlässig, engagiert und sehr hilfsbereit. Durch anregende Diskussionen zeigten sie mir neue Lösungswege und Alternativen auf. Über die Zeit baute sich ein freundschaftliches Verhältnis zu ihnen auf. Ebenfalls vielen lieben Dank für die unzähligen Korrekturstunden.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. med. O. Guntinas-Lichius, dem Direktor der Klinik für Hals-, Nasen, und Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena, für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit in seiner Klinik sowie für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Lehmann, Mitarbeiter des Instituts für Medizinische Statistik, für die freundliche, hilfsbereite sowie zeitintensive Unterstützung in allen statistischen Fragen.

Ebenfalls einen großen Dank möchte ich Herrn C. Greiner-Petter für die angenehme und konstruktive Zusammenarbeit an der Entwicklung der Morphometrie-Software „Histo-Gap“ sowie Herrn P. Westenberger für die engagierte Betreuung und Arbeit an der Software Avizo® Fire 6.3 ausdrücken.

Meiner Familie und meinem Freund danke ich für ihren Rückhalt, ihre tatkräftige, moralische sowie finanzielle Unterstützung und für ihre Geduld.

## **9.11 Lebenslauf**

### **Persönliche Angaben**

Name, Vorname: Diebowski, Sandra  
Wohnhaft in: 07745 Jena, Am Birnstiel 22  
Geburtsdatum: 17.11.1989  
Geburtsort: Bad Frankenhausen

### **Schulbildung**

1996 – 2000      Grundschule Heldrungen  
2000 – 2008      Gymnasium Bad Frankenhausen  
Abschluss Abitur

### **Hochschulstudium**

10/2008 – 09/2010    Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der FSU Jena  
10/2010 – 07/2013    Klinisches Studium der Humanmedizin an der FSU Jena  
08/2013 – 07/2014    Praktisches Jahr  
Oktober 2014          schriftliches Staatsexamen  
November 2014        mündliches Staatsexamen

Jena, 17.02.2014

Sandra Diebowski



## **9.12 Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. G. Schneider, D. Linde, S. Voigt, K. Otto,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfungen eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 17.02.2014

Sandra Diebowski